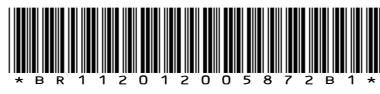




República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112012005872-0 B1



(22) Data do Depósito: 13/09/2010

(45) Data de Concessão: 26/10/2021

(54) Título: BACTÉRIA PRODUTORA DE ÁLCOOL ISOPROPÍLICO E MÉTODO PARA PRODUÇÃO DE ÁLCOOL ISOPROPÍLICO

(51) Int.Cl.: C12N 1/21; C12N 15/09; C12P 7/04.

(30) Prioridade Unionista: 16/09/2009 JP 2009-214694.

(73) Titular(es): MITSUI CHEMICALS, INC..

(72) Inventor(es): TAKASHI MORISHIGE; HITOSHI TAKAHASHI; NOZOMI TAKEBAYASHI; MITSUFUMI WADA.

(86) Pedido PCT: PCT JP2010065770 de 13/09/2010

(87) Publicação PCT: WO 2011/034031 de 24/03/2011

(85) Data do Início da Fase Nacional: 15/03/2012

(57) Resumo: BACTÉRIA PRODUTORA DE ÁLCOOL ISOPROPÍLICO E MÉTODO PARA PRODUÇÃO DE ÁLCOOL ISOPROPÍLICO É revelada uma *Escherichia coli* produtora de álcool isopropílico, que contém pelo menos um gene sacarose hidrolase pertencendo a um grupo de genes de sacarose não PTS, e a qual é fornecida com ou reforçada em, um sistema de produção de álcool isopropílico. Também é revelado um método para produção de álcool isopropílico, em que o álcool isopropílico é produzido a partir de uma matéria-prima derivada de planta, que contém sacarose, usando a *Escherichia coli* produtora de álcool isopropílico.

**BACTÉRIA PRODUTORA DE ÁLCOOL ISOPROPÍLICO E MÉTODO PARA  
PRODUÇÃO DE ÁLCOOL ISOPROPÍLICO**

**CAMPO DA INVENÇÃO**

A presente invenção se refere a uma bactéria produtora  
5 de álcool isopropílico e um método para produção de álcool  
isopropílico.

**ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

O propileno é uma matéria-prima básica importante para  
resinas sintéticas, tais como polipropileno e para produtos  
10 petroquímicos, e é amplamente usado tal como para pára-  
choques de automóveis, recipientes de alimentos, películas  
e instrumentos médicos.

O álcool isopropílico produzido de matérias-primas  
derivadas de plantas pode ser convertido em polipropileno  
15 através de um processo de desidratação. Portanto, o álcool  
isopropílico é uma matéria-prima neutra em carbono  
promissora para o propileno. O protocolo de Kyoto intimou  
as nações industrializadas a reduzirem suas emissões de  
dióxido de carbono total dos níveis de 1990 em 5 por cento  
20 até 2088-2012. Portanto, o propileno neutro em carbono é  
extremamente importante atualmente devido à sua  
versatilidade, em vista do ambiente global.

Bactérias que assimilam matérias-primas derivadas de  
plantas e produzem álcool isopropílico já são conhecidas.  
25 Por exemplo, o WO 2009/008377 revela uma bactéria que foi  
modificada de modo a alcançar alta produção de álcool  
isopropílico de glicose como uma matéria-prima, e descreve  
que a bactéria é um excelente biocatalisador para produção  
industrial de álcool isopropílico.

30 É conhecido que a *Escherichia coli* não pode assimilar

a sacarose. Entretanto, seria industrialmente vantajoso se a sacarose, que é barata dentre os materiais derivados de plantas, pudesse ser utilizada.

De acordo com o conhecimento convencional, o mecanismo de assimilação de sacarose pelos microorganismos é grosseiramente classificado em dois sistemas, i.e., a sacarose PTS (fosfoenolpiruvato: Sistema de Carboidrato fosfotransferase) e a sacarose não PTS (por exemplo, JP-A nº 2001-346578). A sacarose não PTS é conhecida por ser composta de quatro fatores, i.e., cscB (que incorpora a sacarose), cscA (que decompõe a sacarose em microorganismos), cscK (que fosforila a frutose) e cscR (que controla as expressões de cscB, A e K). A Biotechnology Letters, Vol. 27, p. 1891-1896 (2005) descreve que genes desses quatro fatores foram introduzidos em uma Escherichia coli produtora de ácido lático D usando plasmídeos, então produzindo ácido lático D a partir de sacarose.

Adicionalmente, a sacarose PTS é conhecida por ser composta de cinco fatores, i.e., scrA (que incorpora a sacarose), scrY (que fosforila a sacarose), scrB (que decompõe a sacarose em microorganismos), scrR (que controla as expressões de scrA, Y e B) e scrK (que fosforila a frutose).

Quando uma habilidade que um microorganismo não tem deve ser introduzida no microorganismo, a introdução de um gene expressando a habilidade é geralmente estudada. No caso da habilidade de assimilação de sacarose, os DNAs dos fatores cima tem tamanhos de 900 a 1500 bp, e o tamanho de DNA total requerido para expressão de genes de quatro enzimas (tiolase, CoA transferase, acetoacetato

descarboxilase e álcool isopropílico desidrogenase) requerido para alta produção de álcool isopropílico é de aproximadamente 4800 bp. Em outras palavras, a introdução de um DNA tendo um tamanho de aproximadamente 9300 bp seria necessário para transmitir ambas a habilidade de assimilação de sacarose e a habilidade de produção de IPA para a *Escherichia coli*.

Entretanto, a introdução simultânea das mesmas na *Escherichia coli* é extremamente difícil visto que o tamanho do DNA a ser introduzido iria exceder o limite superior do tamanho de DNA que o plasmídeo pode acomodar. Mesmo se dois tipos de vetores de plasmídeo fossem utilizados para reduzir o tamanho de DNA de cada plasmídeo para 10000bp ou menos, um ou ambos os tipos de plasmídeo introduzidos seriam comumente prováveis de serem eliminados durante o crescimento repetitivo. A *Escherichia coli* necessitaria ser continuamente exposta a uma substância antibiótica cara como um marcador de seleção para evitar o problema acima, e tal necessidade não é apropriada para a produção industrial.

Consequentemente, era difícil simultaneamente transmitir ambas as habilidades para assimilar a sacarose e para produzir altamente álcool isopropílico para a *Escherichia coli*.

Can. J.Microbiol., Vol. 45, p. 18-422 (1999) revela que como um resultado da introdução de sacarose hidrolase (cscA) sozinha na *Escherichia coli*, a *Escherichia coli* pode crescer usando sacarose como uma matéria-prima. Entretanto, o artigo também demonstra que quando o gene cscA foi altamente expressado por uma tecnologia de recombinação

genética, quase todos os cscA estavam presentes nas células. Portanto, a cscA (invertase) trabalha dentro das células em vez de fora das células, e não pode ser esperado que a cscA decomponha a sacarose fora das células.

5        Um exemplo de produção de materiais de sacarose usando *Escherichia coli*, a qual não pode assimilar sacarose, é a produção de triptofano usando sacarose como matéria-prima (por exemplo, JP-A Nº 2001-346578). Entretanto, neste exemplo, é demonstrado que a introdução de um grupo de 10 genes incluindo pelo menos cscA, cscB e cscK é necessária de modo a fornecer a habilidade de produzir aminoácidos da sacarose para a *Escherichia coli*.

#### RESUMO DA INVENÇÃO

#### PROBLEMA TÉCNICO A SER RESOLVIDO PELA INVENÇÃO

15        Como discutido anteriormente, era extremamente difícil simultaneamente fornecer a habilidade de assimilar sacarose e a habilidade para produzir altamente álcool isopropílico para a *Escherichia coli*, a qual não pode assimilar sacarose, devido ao tamanho excessivamente grande do DNA a 20 ser introduzido.

Um objetivo da presente invenção é fornecer uma *Escherichia coli* produtora de álcool isopropílico e um método para produção de álcool isopropílico que são úteis para produção eficiente de álcool isopropílico a partir de 25 sacarose, que é barata e tem um valor utilitário industrial alto.

A presente invenção fornece uma *Escherichia coli* produtora de álcool isopropílico e um método para produção de álcool isopropílico como descritos abaixo.

30        MEIOS PARA SOLUÇÃO DO PROBLEMA

[1] *Escherichia coli* produtora de álcool isopropílico incluindo pelo menos um gene de sacarose hidrolase que pertence a um grupo de genes de sacarose não PTS, e um sistema de produção de álcool isopropílico fornecido ou 5 intensificado.

[2] *Escherichia coli* produtora de álcool isopropílico de acordo com [1], incluindo apenas o gene de sacarose hidrolase dentre os genes pertencendo ao grupo de genes de sacarose não PTS.

10 [3] *Escherichia coli* produtora de álcool isopropílico de acordo com [1] ou [2], em que a *Escherichia coli* produtora de álcool isopropílico é uma *Escherichia coli* na qual uma atividade acetoacetato descarboxilase, uma atividade álcool isopropílico desidrogenase, uma atividade 15 CoA transferase e uma atividade tiolase foram transmitidas.

[4] *Escherichia coli* produtora de álcool isopropílico de acordo com [3], em que a atividade acetoacetato descarboxilase, a atividade álcool isopropílico desidrogenase, a atividade CoA transferase e a atividade 20 tiolase são obtidas pela introdução de genes que codificam as respectivas enzimas que são derivadas de pelo menos uma selecionada do grupo consistindo em bactérias do gênero *Clostridium*, bactérias do gênero *Bacillus* e bactérias do gênero *Escherichia*.

25 [5] *Escherichia coli* produtora de álcool isopropílico de acordo com [3], em que a atividade acetoacetato descarboxilase e a atividade álcool isopropílico desidrogenase são obtidas pela introdução de genes que codificam as respectivas enzimas que são derivadas de 30 bactéria ou bactérias de gênero *Clostridium*, e a atividade

CoA transferase e a atividade tiolase são obtidas pela introdução de genes que codificam as respectivas enzimas que são derivadas de uma bactéria ou bactérias do gênero *Escherichia*.

5 [6] *Escherichia coli* produtora de álcool isopropílico de acordo com [3], em que a atividade acetoacetato descarboxilase é obtida pela introdução de um gene que codifica uma enzima derivada de *Clostridium acetobutylicum*, a atividade álcool isopropílico desidrogenase é obtida pela  
10 introdução de um gene que codifica uma enzima derivada de *Clostridium beijerinckii*, e a atividade CoA transferase e a atividade tiolase são obtidas pela introdução de genes que codificam as respectivas enzimas derivadas de *Escherichia coli*.

15 [7] *Escherichia coli* produtora de álcool isopropílico de acordo com [3], em que um gene que codifica a acetoacetato descarboxilase, um gene que codifica a álcool isopropílico desidrogenase, e o gene que codifica a sacarose hidrolase foi introduzido utilizando pelo menos um  
20 plasmídeo, e a atividade CoA transferase e a atividade tiolase são obtidas de genes genômicos na hospedeira *Escherichia coli*.

[8] *Escherichia coli* produtora de álcool isopropílico de acordo com [7], em que um promotor para expressar um  
25 gene que codifica a CoA transferase e um gene que codifica a tiolase é pelo menos um de um promotor gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase ou um promotor serina hidroximetiltransferase.

[9] *Escherichia coli* produtora de álcool isopropílico  
30 de acordo com [3], em que a atividade acetoacetato

descarboxilase, a atividade álcool isopropílico desidrogenase, a atividade CoA transferase e a atividade tiolase são todas obtidas pela introdução de genes que codificam as respectivas enzimas derivadas de uma bactéria 5 ou bactérias do gênero *Clostridium*.

[10] Método para produção de álcool isopropílico, incluindo a produção de álcool isopropílico de uma matéria-prima derivada de planta contendo sacarose usando a *Escherichia coli* produtora de álcool isopropílico conforme 10 definido em [1] a [9].

#### BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Fig. 1 é um gráfico mostrando a quantidade de redução em açúcares na cultura sobrenadante quando uma cepa de *Escherichia coli* é cultivada por 10 horas usando glicose 15 e frutose como fontes de açúcar.

#### DESCRIÇÃO DAS MODALIDADES

Uma *Escherichia coli* produtora de álcool isopropílico de acordo com a presente invenção é uma *Escherichia coli* produtora de álcool isopropílico que inclui pelo menos um 20 gene de sacarose hidrolase pertencendo ao grupo de genes de sacarose não PTS, e um sistema de produção de álcool isopropílico fornecido ou intensificado.

Um método de produção de álcool isopropílico de acordo com a presente invenção é um método de produção de álcool 25 isopropílico que inclui a produção de álcool isopropílico de uma matéria-prima derivada de planta contendo sacarose usando a *Escherichia coli* produtora de álcool isopropílico acima descrita.

A *Escherichia coli* produtora de álcool isopropílico de 30 acordo com a presente invenção inclui pelo menos um gene de

sacarose hidrolase que é um membro de um grupo de genes de sacarose não PTS, e também um sistema de produção de álcool isopropílico. Portanto, a *Escherichia coli*, que não possui habilidade natural para assimilar sacarose, simultaneamente exerce a habilidade de assimilar a sacarose e a habilidade de produzir álcool isopropílico, de modo que o álcool isopropílico pode ser eficientemente produzido a partir de sacarose. Até aqui, não existe nenhum relatório sobre um caso no qual o grupo de genes de sacarose não PTS é introduzido na *Escherichia coli*, a qual não possui habilidade de assimilação de sacarose, para produzir álcool isopropílico usando sacarose como uma fonte de carbono.

A presente invenção descobriu que, como um resultado da introdução de pelo menos um gene de sacarose hidrogenase que é um membro do grupo de genes que constituem o grupo de genes de sacarose não PTS em uma *Escherichia coli* produtora de álcool isopropílico, a sacarose pode ser assimilada com alta eficiência na *Escherichia coli* que altamente produz álcool isopropílico. Como um resultado disto, o tamanho do DNA a ser introduzido para transmitir a habilidade de assimilação de sacarose pode ser reduzido notavelmente, por meio do qual é possível simultaneamente conectar um DNA para transmitir a habilidade de assimilação de sacarose e um DNA para transmitir a habilidade de produção de álcool isopropílico em um único vetor de plasmídeo. Por meio disso, a habilidade de assimilação de sacarose e a habilidade de produção de ácido isopropílico podem ser simultaneamente transmitidas à *Escherichia coli*, que não pode assimilar sacarose, de modo que o álcool isopropílico pode ser eficientemente obtido da sacarose barata derivada

de cana de açúcar ou açúcar de beterraba, os quais podem ser fornecidos em largas quantidades.

Em particular, a *Escherichia coli* produtora de álcool isopropílico de acordo com a presente invenção é capaz de assimilar a glicose e frutose - produtos de decomposição da sacarose - quase simultaneamente, e produzir álcool isopropílico. Portanto, a *Escherichia coli* de acordo com a invenção possui uma maior eficiência.

Em geral, em *Escherichia coli*, é conhecido que a absorção de glicose geralmente tem prioridade sobre a absorção de frutose, e a frutose não é suficientemente metabolizada na presença de glicose. Consequentemente, é surpreendente que o álcool isopropílico possa ser eficientemente produzido sem ser afetado pela repressão catabólica da glicose.

Na presente invenção, o termo "hospedeiro" significa *Escherichia coli* que vai se tornar a *Escherichia coli* produtora de álcool isopropílico de acordo com a presente invenção, como um resultado da introdução de um ou mais genes de fora da célula.

O escopo do termo "processo" como utilizado aqui inclui não apenas um processo descontínuo, mas também um processo que não pode ser claramente distinto de outro processo enquanto o efeito esperado do processo de interesse é alcançado.

Adicionalmente, qualquer faixa numérica expressa aqui usando "até" inclui os valores numéricos antes e após o "até" como os valores mínimo e máximo, respectivamente.

A seguir, a presente invenção será descrita.

O grupo de genes de sacarose não PTS na presente

invenção se refere ao grupo de quatro genes envolvido no sistema não PTS dentre as rotas de assimilação de sacarose de um microorganismo. Especificamente, o grupo de genes de sacarose não PTS é um grupo de genes composto de uma proteína repressora (cscR), uma sacarose hidrolase (cscA), uma frutoquinase (cscK) e uma sacarose permease (cscB). Na presente invenção, pelo menos uma das mesmas, incluindo pelo menos cscA, pode ser usada. Por exemplo, apenas cscA, uma combinação de cscA e cscK, uma combinação de cscA e 10 cscB, uma combinação de cscA e cscR, uma combinação de cscA, cscR e cscK ou uma combinação de cscA, cscR e cscB, pode ser usada. Em particular, do ponto de vista da produção mais eficiente de álcool isopropílico, é preferível que apenas um gene que codifica cscA seja 15 incluído enquanto os outros genes do grupo de sacarose não PTS não sejam incluídos.

A sacarose hidrolase (invertase, CscA) na presente invenção se refere ao nome genérico de enzimas que são classificadas como enzima de código numérico: 3.2.1.26 com 20 base no relatório da Enzyme Commission of the International Union of Biochemistry (I.U.B), as quais catalisam uma reação de produção de glicose D e frutose D a partir de sacarose.

Esta enzima é uma enzima que a *Escherichia coli*, tal 25 como a cepa K12 e a cepa B não possui naturalmente, e é uma das enzimas da rota metabólica de não PTS incluindo um simpórter de próton, uma invertase, uma frutoquinase e um repressor específico de sacarose (ver Canadian Journal of Microbiology, (1991) vol. 45, p.418-422). Na presente 30 invenção, como um resultado do fornecimento de CscA,

particularmente como um resultado do fornecimento de apenas cscA, sacarose extracelular é decomposta em glicose e frutose na membrana da célula, e a glicose e frutose são liberadas para fora da célula, e fosforilados e 5 incorporados no citoplasma via uma glicose PTS e uma frutose PTS. Como um resultado, a frutose é fornecida a um sistema metabólico de frutose em uma bactéria para permitir assimilação usando um sistema glicolítico.

Como um gene de sacarose hidrolase (invertase, CscA) a 10 ser introduzido na bactéria hospedeira na presente invenção, um DNA tendo a sequência base de um gene que codifica a sacarose hidrolase (CscA) obtido de um organismo que possui a enzima, ou uma sequência sintética de DNA que é sintetizada com base em uma sequência base conhecida do 15 gene, podem ser utilizados. Exemplos preferíveis incluem aqueles derivados das bactérias do gênero *Erwinia*, bactérias do gênero *Proteus*, bactérias do gênero *Vibrio*, bactérias do gênero *Agrobacterium*, bactérias do gênero *Rhizobium*, bactérias do gênero *Staphylococcus*, bactérias do 20 gênero *Bifidobacterium*, e bactérias do gênero *Escherichia*. Um exemplo é um DNA tendo a sequência base do gene derivado de uma cepa de *Escherichia coli* 0157. Particularmente preferido é um DNA tendo a sequência base do gene derivado de uma cepa de *Escherichia coli* 0157. É preferível que a 25 sequência sinal para a transferência de cscA para o periplasma da célula bacteriana tenha sido adicionada ao cscA.

Como um gene da proteína repressora (CscR) a ser introduzido na bactéria hospedeira na presente invenção, um 30 DNA tendo a sequência base de um gene que codifica a

proteína repressora (CscR) obtido de um organismo possuindo a enzima, ou uma sequência de DNA sintética que é sintetizada com base em uma sequência base conhecida do gene, podem ser usados. Exemplos preferíveis incluem 5 aqueles derivados de bactérias do gênero *Erwinia*, bactérias do gênero *Proteus*, bactérias do gênero *Vibrio*, bactérias do gênero *Agrobacterium*, bactérias do gênero *Rhizobium*, bactérias do gênero *Staphylococcus*, bactérias do gênero *Bifidobacterium* e bactérias do gênero *Escherichia*. Um 10 exemplo é um DNA tendo a sequência base do gene derivado de uma cepa de *Escherichia coli* 0157. O DNA tendo a sequência base do gene derivado de uma cepa de *Escherichia coli* 0157 é particularmente preferível.

Como um gene da frutoquinase (CscK) a ser introduzido 15 na bactéria hospedeira na presente invenção, um DNA tendo a sequência base de um gene que codifica a frutoquinase (CscK) obtido de um organismo possuindo a enzima, ou uma sequência de DNA sintética que é sintetizada com base em uma sequência base conhecida do gene, podem ser usados. 20 Exemplos preferíveis incluem aqueles derivados de bactérias do gênero *Erwinia*, bactérias do gênero *Proteus*, bactérias do gênero *Vibrio*, bactérias do gênero *Agrobacterium*, bactérias do gênero *Rhizobium*, bactérias do gênero *Staphylococcus*, bactérias do gênero *Bifidobacterium* e 25 bactérias do gênero *Escherichia*. Um exemplo é um DNA tendo a sequência base do gene derivado de uma cepa de *Escherichia coli* 0157. O DNA tendo a sequência base do gene derivado de uma cepa de *Escherichia coli* 0157 é particularmente preferível.

30 Como um gene da sacarose permease (CscB) a ser

introduzido na bactéria hospedeira na presente invenção, um DNA tendo a sequência base de um gene que codifica a sacarose permease (CscB) obtido de um organismo possuindo a enzima, ou uma sequência de DNA sintética que é sintetizada 5 com base em uma sequência base conhecida do gene, podem ser usados. Exemplos preferíveis incluem aqueles derivados de bactérias do gênero *Erwinia*, bactérias do gênero *Proteus*, bactérias do gênero *Vibrio*, bactérias do gênero *Agrobacterium*, bactérias do gênero *Rhizobium*, bactérias do 10 gênero *Staphylococcus*, bactérias do gênero *Bifidobacterium* e bactérias do gênero *Escherichia*. Um exemplo é um DNA tendo a sequência base do gene derivado de uma cepa de *Escherichia coli* 0157. O DNA tendo a sequência base do gene derivado de uma cepa de *Escherichia coli* 0157 é 15 particularmente preferível.

A *Escherichia coli* produtora de álcool isopropílico na presente invenção se refere à *Escherichia coli* que possui a habilidade de produzir álcool isopropílico, a qual foi introduzida ou modificada por recombinação genética. Devido 20 ao fato da *Escherichia coli* produtora de álcool isopropílico possuir a habilidade introduzida ou modificada de produzir álcool isopropílico em combinação com a atividade CscA mencionada acima, até mesmo a *Escherichia coli*, que não possui habilidade de assimilação de sacarose 25 natural, se torna capaz de produzir efetivamente álcool isopropílico a partir da sacarose.

O escopo da frase "por recombinação genética" como usada na presente invenção inclui qualquer mudança na seqüência base causada pela inserção de outro DNA na 30 seqüência base de um gene nativo , ou pela substituição ou

deleção de uma região específica de um gene, ou por qualquer combinação das mesmas. Por exemplo, a recombinação genética pode resultar da mutação.

Na presente invenção a assimilação de sacarose se refere à habilidade de incorporar em um organismo vivo, a própria sacarose ou pela conversão da sacarose em uma substância tendo um maior ou menor peso molecular, preferivelmente em uma substância tendo um menor peso molecular, ou se refere à habilidade de converter metabolicamente sacarose em outra substância. O escopo de assimilação como usado na presente invenção inclui a decomposição pela qual a sacarose é convertida em uma substância tendo um menor peso molecular, e especificamente inclui a decomposição de sacarose em glicose D e frutose D.

O sistema de produção de álcool isopropílico na presente invenção pode ser qualquer sistema que permita a *Escherichia coli* alvo produzir álcool isopropílico.

Na presente invenção o sistema de produção de álcool isopropílico fornecido ou intensificado se refere a uma estrutura para demonstrar a habilidade de produção de álcool isopropílico que foi introduzida ou modificada pela recombinação genética. O sistema de produção de álcool isopropílico pode ser qualquer sistema de produção de álcool isopropílico que aumenta a produção de álcool isopropílico da *Escherichia coli* alvo quando comparada a sua produção de álcool isopropílico original. Exemplos preferíveis incluem inativação, redução ou intensificação da atividade enzimática envolvida com a atividade de produção de álcool isopropílico, ou uma combinação dos mesmos. Devido ao sistema de produção de álcool

isopropílico em combinação com a atividade CscA mencionada acima, o qual não tem a habilidade natural de assimilação de sacarose, se torna capaz de produzir efetivamente álcool isopropílico da sacarose.

5        Um exemplo preferível é o fornecimento de atividade enzimática aumentada envolvida com a produção de álcool isopropílico. Um exemplo mais preferível é o aumento da atividade enzimática da tiolase, CoA transferase, acetoacetato descarboxilase, e álcool isopropílico  
10      desidrogenase. Em outras palavras, quatro tipos de atividade enzimática, i.e., atividade acetoacetato descarboxilase, atividade álcool isopropílico desidrogenase, atividade CoA transferase, e atividade tiolase são preferivelmente transmitidos à *Escherichia coli*  
15      produtora de álcool isopropílico de acordo com a presente invenção.

Na presente invenção, o escopo do "fornecimento" de atividade inclui a introdução de um gene que codifica uma enzima de fora da célula bacteriana da bactéria hospedeira para dentro da célula bacteriana, e adicionalmente inclui alta expressão de um gene de enzima pela intensificação da atividade promotora de um gene de enzima que a bactéria hospedeira possui no genoma da mesma ou pela substituição com outro promotor.

25      Na presente invenção, a acetoacetato descarboxilase se refere a um nome genérico de enzimas as quais são classificadas como a enzima de código numérico: 4.1.1.4 com base no relatório da Enzyme Commission of the International Union of Biochemistry (I.U.B.), e que catalisam a reação de  
30      produção de acetona a partir de acetoacetato.

Exemplos das enzimas incluem aquelas derivadas de bactérias do gênero *Clostridium*, tais como *Clostridium acetobutylicum* e *Clostridium beijerinckii*, e bactérias do gênero *Bacillus* tais como *Bacillus polymyxa*.

5 Como um gene da acetoacetato descarboxilase a ser introduzido na bactéria hospedeira da presente invenção, um DNA tendo uma sequência base de um gene que codifica a acetoacetato descarboxilase obtida de qualquer uma das enzimas originadas dos organismos listadas acima, ou uma  
10 sequência de DNA sintética que é sintetizada com base em uma sequência base conhecida de um gene, podem ser usados. Exemplos preferíveis incluem aqueles derivados das bactérias do gênero *Clostridium* ou bactérias do gênero *Bacillus*. Um exemplo é um DNA tendo a sequência base do  
15 gene derivado de *Clostridium acetobutylicum* ou *Bacillus polymyxa*. Um DNA tendo a seqüência base do gene derivado de *Clostridium acetobutylicum* é particularmente preferível.

Na presente invenção, o álcool isopropílico desidrogenase se refere a um nome genérico de enzimas que  
20 são classificadas como enzimas de código numérico: 1.1.1.80 com base no relatório da Enzyme Commission of the International Union of Biochemistry (I.U.B), e que catalisam uma reação de produção de álcool isopropílico a partir de acetona. Exemplos das enzimas incluem aquelas  
25 derivadas das bactérias do gênero *Clostridium*, tais como *Clostridium beijerinckii*.

Como um gene de álcool isopropílico desidrogenase a ser introduzido na bactéria hospedeira da presente invenção, um DNA tendo uma sequência base de um gene que  
30 codifica o álcool isopropílico desidrogenase obtido de

qualquer uma das enzimas originadas dos organismos listados acima, ou uma sequência de DNA sintética que é sintetizada com base em uma sequência base conhecida de um gene, podem ser usados. Exemplos preferíveis incluem aqueles derivados 5 das bactérias do gênero *Clostridium*, tal como um DNA tendo a sequência base do gene derivado de *Clostridium beijerinckii*.

Na presente invenção, a CoA transferase se refere a um nome genérico de enzimas as quais são classificadas como a 10 enzima de código numérico: 2.8.3.8 com base no relatório da Enzyme Commission of the International Union of Biochemistry (I.U.B.), e que catalisam a reação de produção de acetoacetato a partir de acetoacetil CoA.

Exemplos da enzima incluem aquelas derivadas das 15 bactérias do gênero *Clostridium*, tais como *Clostridium acetobutylicum* e *Clostridium beijerinckii*, bactérias do gênero *Roseburia*, tais como *Roseburia intestinalis*, bactérias do gênero *Faecalibacterium*, tais como *Faecalibacterium prausnitzii*, bactérias do gênero 20 *Coprococcus*, bactérias do gênero *Trypanosoma*, tais como *Trypanosoma brucei*, e bactérias do gênero *Escherichia*, tais como *Escherichia coli*.

Como um gene da CoA transferase a ser introduzido na bactéria hospedeira da presente invenção, um DNA tendo uma 25 sequência base de um gene que codifica a CoA transferase obtido de qualquer uma das enzimas originadas dos organismos listados acima, ou uma sequência de DNA sintética que é sintetizada com base em uma sequência base conhecida de um gene, podem ser usados. Exemplos 30 preferíveis incluem um DNA tendo uma sequência base de um

gene derivado de uma bactéria do gênero *Clostridium*, tal como *Clostridium acetobutylycum*, uma bactéria do gênero *Roseburia*, tal como *Roseburia intestinalis*, uma bactéria do gênero *Faecalibacterium*, tal como *Faecalibacterium prausnitzii*, uma bactéria do gênero *Coprococcus*, uma bactéria do gênero *Trypanosoma*, tal como *Trypanosoma brucei*, ou uma bactéria do gênero *Escherichia*, tal como *Escherichia coli*. Um DNA tendo a seqüência base do gene derivado de uma bactéria do gênero *Clostridium* ou uma bactéria do gênero *Escherichia* é mais preferível, e um DNA tendo uma sequência base de um gene derivado de *Clostridium acetobutylycum* ou de *Escherichia coli* é particularmente preferível.

Na presente invenção, tiolase se refere a um nome genérico de enzimas as quais são classificadas como a enzima de código numérico: 2.3.1.9 com base no relatório da Enzyme Commission of the International Union of Biochemistry (I.U.B.), e que catalisam a reação de produção de acetoacetil CoA a partir de acetil CoA.

Exemplos da enzima incluem aquelas derivadas de bactérias do gênero *Clostridium*, tais como *Clostridium acetobutylicum* e *Clostridium beijerinckii*, bactérias do gênero *Escherichia*, tais como *Escherichia coli*, bactérias da espécie *Halobacterium*, bactérias do gênero *Zoogloea*, tais como *Zoogloea ramigera*, bactérias da espécie *Rhizobium*, bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, tais como *Bradyrhizobium japonicum*, bactérias do gênero *Candida*, tais como *Candida tropicalis*, bactérias do gênero *Caulobacter*, tais como *Caulobacter crescentus*, bactérias do gênero *Streptomyces*, tais como *Streptomyces collinus*, e bactérias

do gênero *Enterococcus*, tais como *Enterococcus faecalis*.

Como um gene da tiolase a ser introduzido na bactéria hospedeira da presente invenção, um DNA tendo uma sequência base de um gene que codifica a tiolase obtido de qualquer 5 uma das enzimas originadas dos organismos listados acima, ou uma sequência de DNA sintética que é sintetizada com base em uma sequência base conhecida de um gene, podem ser usados. Exemplos preferíveis incluem um DNA tendo uma sequência base de um gene derivado de uma bactéria do 10 gênero *Clostridium*, tal como *Clostridium acetobutylicum* ou *Clostridium beijerinckii*, uma bactéria do gênero *Escherichia*, tal como *Escherichia coli*, uma bactéria da espécie *Halobacterium*, uma bactéria do gênero *Zoogloea*, tal 15 como *Zoogloea ramigera*, o gênero *Gallus*, tal como *Gallus gallus*, uma bactéria da espécie *Rhizobium*, uma bactéria do gênero *Bradyrhizobium*, tal como *Bradyrhizobium japonicum*, uma bactéria do gênero *Candida*, tal como *Candida tropicalis*, uma bactéria do gênero *Caulobacter*, tal como 20 *Caulobacter crescentus*, uma bactéria do gênero *Streptomyces*, tal como *Streptomyces collinus*, ou uma bactéria do gênero *Enterococcus*, tal como *Enterococcus faecalis*. Um DNA tendo a seqüência base do gene derivado de uma bactéria do gênero *Clostridium* ou de uma bactéria do gênero *Escherichia* é mais preferível, e um DNA tendo a 25 seqüência base do gene derivado de *Clostridium acetobutylicum* ou *Escherichia coli* é particularmente preferível.

Dentre eles, do ponto de vista da atividade enzimática, é preferível que cada uma dos quatro tipos de 30 enzima seja uma enzima derivada de pelo menos um

selecionado do grupo consistindo de uma bactéria do gênero *Clostridium*, uma bactéria do gênero *Bacillus*, e uma bactéria do gênero *Escherichia*. Em particular, um caso no qual a acetoacetato descarboxilase e a álcool isopropílico desidrogenase são derivadas de uma bactéria ou bactérias do gênero *Clostridium*, e a atividade CoA transferase e a atividade tiolase são derivadas de uma bactéria ou bactérias do gênero *Escherichia*, e um caso no qual os quatro tipos de enzima são todos derivados de uma bactéria ou bactérias do gênero *Clostridium*, são mais preferíveis.

Em particular, do ponto de vista da atividade enzimática, é preferível que cada uma dos quatro tipos de enzima na presente invenção seja derivada de qualquer um de *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii* ou *Escherichia coli*. Mais preferivelmente, a acetoacetato descarboxilase é uma enzima derivada de *Clostridium acetobutylicum*, cada uma da CoA transferase e tiolase é uma enzima derivada de *Clostridium acetobutylicum* ou *Escherichia coli*, e o álcool isopropílico desidrogenase é uma enzima derivada de *Clostridium beijerinckii*. Com respeito aos quatro tipos de enzima, particularmente preferíveis, a atividade acetoacetato descarboxilase é derivada de *Clostridium acetobutylicum*, a atividade álcool isopropílico desidrogenase é derivada de *Clostridium beijerinckii*, e a atividade CoA transferase e a atividade tiolase são derivadas de *Escherichia coli*, do ponto de vista da atividade enzimática.

Quando a atividade CoA transferase e a atividade tiolase são derivadas de *Escherichia coli*, preferivelmente, o gene que codifica a acetoacetato descarboxilase, o gene

que codifica a álcool isopropílico desidrogenase e o gene que codifica a sacarose hidrolase são introduzidos por pelo menos um plasmídeo, e a atividade CoA transferase e a atividade tiolase são obtidas a partir de genes genômicos 5 na *Escherichia coli* hospedeira, do ponto de vista da habilidade de produção de álcool isopropílico.

Na presente invenção, um exemplo de *Escherichia coli* da qual a atividade enzimática envolvida na produção de álcool isopropílico é aumentada para produzir álcool 10 isopropílico é a cepa pIPA/B ou a cepa pIaaa/B descritas no WO 2009/008377.

O gene promotor na invenção pode ser qualquer promotor que é capaz de controlar a expressão de um gene dentre os genes acima. O gene promotor pode ser um promotor poderoso 15 que constitutivamente trabalha no microorganismo, e que não é suscetível de repressão de expressão mesmo na presença de glicose. Exemplos específicos dos mesmos incluem o promotor de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (daqui para frente também referido como GAPDH) ou o promotor de serina 20 hidroximetiltransferase.

O promotor na presente invenção significa uma região na qual uma RNA polimerase tendo ligamentos de um fator sigma para começar a transcrição. Por exemplo, um promotor GAPDH derivado de *Escherichia coli* é descrito nas Bases nº. 25 397-440 na informação de sequência base do número de acesso X02662 no Genbank.

Os genes CoA transferase (atoD e atoA) e um gene tiolase (atoB), cada um dos quais é derivado de *Escherichia coli*, forma um operon no genoma de *Escherichia coli* na 30 ordem de atoD, atoA e atoB (Journal of Bacteriology Vol.

169 p. 42-52 Lauren Sallus Jenkis, at al.). Portanto, as expressões dos genes da CoA transferase e do gene da tiolase podem ser simultaneamente controladas pela modificação do promotor de *atoD*).

5 Em vista do acima, quando a atividade CoA transferase e a atividade tiolase são obtidas de genes genômicos da *Escherichia coli* hospedeira, é preferível para aumentar a expressão de ambos genes enzimáticos, por exemplo, repondo o promotor responsável pela expressão de ambos genes 10 enzimáticos por outro promotor, do ponto de vista de obtenção de habilidade de produção de álcool isopropílico suficiente. Exemplos do promotor a ser usado de modo a aumentar a atividade CoA transferase e a atividade tiolase incluem o promotor GAPDH derivado de *Escherichia coli* acima 15 descrito.

A atividade daquelas enzimas na presente invenção pode ser fornecida pela introdução de atividade enzimática de fora da célula bacteriana para dentro da célula bacteriana, ou pela alta expressão dos genes enzimáticos que a bactéria 20 hospedeira tem no seu genoma pelo aumento da atividade promotora dos genes enzimáticos ou substituição com outro promotor.

A introdução da atividade enzimática pode ser realizada pela, por exemplo, introdução de genes que 25 codificam os quatro tipos de enzima de fora da célula bacteriana da bactéria hospedeira para dentro da célula bacteriana utilizando uma técnica de recombinação genética. Aqui, os genes enzimáticos a serem introduzidos podem ser da mesma espécie ou heteroespecíficos para a célula 30 hospedeira. Métodos de preparação do DNA genômico

necessário para a introdução do gene de fora da célula bacteriana para dentro da célula, a clivagem e ligação de DNAs, transformação, PCR (Reação de Polimerase em Cadeia), o design e síntese dos oligonucleotideos usados como iniciadores, e os similares, podem ser realizados por métodos comuns bem conhecidos por aqueles técnicos no assunto. Aqueles métodos são descritos em, por exemplo, Sambrook, J., et. Al., "Molecular Cloning A Laboratory Manual, Second Edition", Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989).

O escopo do "fornecimento" ou "aumento" de habilidade como usado na presente invenção inclui a introdução de um gene que codifica enzima de fora da célula bacteriana da bactéria hospedeira para dentro da célula bacteriana, e adicionalmente inclui a alta expressão de um gene enzimático pelo aumento da atividade promotora de um gene enzimático que a bactéria hospedeira possui no seu genoma ou pela substituição com outro promotor.

Na presente invenção, a *Escherichia coli* para qual a atividade enzimática foi fornecida se refere à *Escherichia coli* para qual a atividade enzimática foi fornecida de fora da célula bacteriana para dentro da célula bacteriana usando um certo método. Tal *Escherichia coli* pode ser produzida utilizando um método de, por exemplo, introdução de um gene que codifica a enzima e proteína de fora da célula bacteriana para dentro da célula bacteriana usando a técnica de recombinação genética conforme descrita acima.

Na presente invenção, *Escherichia coli* da qual a atividade enzimática é aumentada se refere à *Escherichia coli* da qual a atividade enzimática é aumentada por um

certo método. Tal *Escherichia coli* pode ser produzida utilizando um método de, por exemplo, introdução de um gene que codifica a enzima e proteína de fora da célula bacteriana para dentro da célula bacteriana usando um plasmídeo e usando a técnica de recombinação genética conforme descrita acima, ou causando altas expressões de um gene enzimático que a *Escherichia coli* hospedeira possui no seu genoma pelo aumento da atividade promotora do gene enzimático ou substituição com outro promotor.

Na presente invenção, *Escherichia coli* significa *Escherichia coli* que pode ser feita para possuir a habilidade para produzir álcool isopropílico de uma matéria-prima derivada de planta utilizando um certo meio, indiferente de se a *Escherichia coli* originalmente tem ou não a habilidade para produzir álcool isopropílico de uma matéria-prima derivada de planta.

Aqui, a *Escherichia coli* para qual os respectivos genes a serem introduzidos pode não ter a habilidade de produção de álcool isopropílico, e pode ser qualquer *Escherichia coli* que permita a introdução ou modificação dos respectivos genes.

A *Escherichia coli* pode ser preferencialmente a *Escherichia coli* a qual a habilidade de produção de álcool isopropílico foi transferida anteriormente. Ao utilizar tal *Escherichia coli*, álcool isopropílico pode ser eficientemente produzido. Especialmente, de acordo com a presente invenção, a capacidade de assimilação da sacarose pode ser transferida para a *Escherichia coli* a qual não possui originalmente a habilidade de assimilação de sacarose, através da qual álcool isopropílico pode ser

eficientemente produzido. Exemplos de *Escherichia coli* que não possui originalmente a habilidade de assimilação de sacarose incluem cepa K12, cepa B, cepa C e cepas derivadas das mesmas.

5        Um exemplo de tal *Escherichia coli* produtora de álcool isopropílico é uma bactéria produtora de álcool isopropílico para qual a atividade acetoacetato descarboxilase, a atividade álcool isopropílico desidrogenase, a atividade CoA transferase e a atividade 10 tiolase foram fornecidas de modo a ser capaz de produzir álcool isopropílico de uma matéria-prima derivada de planta, e a qual é descrita no pedido de WO 2009/008377.

Um método para produção de álcool isopropílico de acordo com a presente invenção inclui a produção de álcool 15 isopropílico de uma matéria-prima derivada de planta contendo sacarose, pelo uso da *Escherichia coli* produtora de álcool isopropílico acima descrita. Mais especificamente, o método inclui um processo no qual a *Escherichia coli* produtora de álcool isopropílico acima 20 descrita é colocada em contato com uma matéria-prima derivada de planta contendo sacarose e cultivada, e um processo de coleta no qual o álcool isopropílico gerado como um resultado do contato é coletado.

A matéria-prima derivada de planta usada no método de 25 produção de álcool isopropílico acima descrito pode ser sem limitação particular qualquer matéria-prima derivada de planta contendo sacarose, que é uma fonte de carbono obtida de uma planta. Na presente invenção, a matéria-prima derivada de planta se refere a órgãos tais como raízes, 30 pedúnculos, caules, ramos de árvore, folhas, flores, e

sementes, corpos de planta incluindo os órgãos da planta, e produtos de decomposição dos órgãos da planta, e adicionalmente incluem fontes de carbono que podem ser usados como fontes de carbono pelos microorganismos durante o cultivo dentre as fontes de carbono obtidas dos corpos de planta, órgãos da planta, ou produtos de decomposição dos mesmos.

As fontes de carbono incluídos em tais matérias-primas derivadas de planta geralmente incluem, além de sacarose, açúcares como amido, glicose, frutose, xilose, e arabinose, ou produtos de decomposição de planta herbáceos e ligneos ou hidrolisados de celulose, cada um dos quais contém os ingredientes acima em grandes quantidades, e combinações dos mesmos. As fontes de carbono na presente invenção podem adicionalmente incluir glicerina ou ácidos graxos derivados de óleo vegetal.

Exemplos preferíveis da matéria-prima derivada de planta na presente invenção incluem produtos agrícolas tais como cereal, milho, arroz, trigo, soja, cana-de-açúcar, beterraba, algodão e similares, ou combinações dos mesmos. A forma dos mesmos como a matéria-prima não é especificamente limitada, e pode ser um produto cru, suco espremido, um produto moido, ou semelhantes. Alternativamente, a matéria-prima derivada de planta pode estar numa forma que consiste da fonte de carbono sozinha.

No processo de cultura, o contato entre a *Escherichia coli* produtora de álcool isopropílico e uma matéria-prima derivada de planta é geralmente feito através da cultura *Escherichia coli* produtora de álcool isopropílico em um meio de cultura contendo a matéria-prima derivada de

planta.

A densidade de contato entre a matéria-prima derivada de planta e a *Escherichia coli* produtora de álcool isopropílico pode ser variada dependendo da atividade da *Escherichia coli* produtora de álcool isopropílico. Em geral, a concentração da matéria-prima derivada de planta no meio de cultura pode ser tal que a concentração de açúcar inicial em termos de glicose pode ser ajustada para ser de 20% em massa ou inferior em relação à massa total da mistura. Do ponto de vista da tolerância de açúcar da *Escherichia coli*, a concentração de açúcar inicial é de preferência ajustada para ser de 15% em massa ou inferior. Outros componentes podem ser adicionados em quantidades usuais de adição para meios de cultura de microorganismos, sem limitação particular.

O teor da *Escherichia coli* produtora de álcool isopropílico em meio de cultura pode ser variado com o tipo e a atividade da *Escherichia coli*, e a quantidade de um líquido de pré-cultura bacteriana a ser adicionado quando se inicia o cultivo pode geralmente ser ajustada para ser de 0,1 a 30% em massa em relação ao líquido de cultura, e é preferencialmente ajustado para ser de 1 a 10% em massa em relação ao líquido de cultura do ponto de vista de controle das condições de cultura.

O meio de cultura a ser utilizado para a cultura da *Escherichia coli* produtora de álcool isopropílico, pode ser qualquer meio de cultura que inclui uma fonte de carbono, uma fonte de nitrogênio, íons inorgânicos, e elementos-traço orgânicos, ácidos nucléicos, vitaminas e similares requeridos pelos microorganismos para a produção de álcool

isopropílico, sem limitação particular.

Além da sacarose, açúcares tais como glicose, frutose e melaços, ácidos orgânicos tais como ácido fumárico, ácido cítrico e ácido succínico, e álcoois tais como metanol, 5 etanol e glicerol, e semelhantes são usados como fontes de carbono, conforme apropriado. Fontes de nitrogênio inorgânico tais como sais de amônio orgânicos, sais de amônio inorgânicos, gás amônia, e amônia aquosa, fontes de nitrogênio orgânico tais como hidrolisados de proteína, e 10 semelhantes são usados como fontes de nitrogênio, conforme apropriado. Um ion de magnésio, um ion fosfato, um ion de potássio, um ion de ferro, um ion de manganês, e semelhantes são utilizados como íons inorgânicos, como apropriado, de acordo com a necessidade.

15 Vitaminas, aminoácidos, e semelhantes, e extratos de levedura, peptona, solução de maceração de milho, produtos de decomposição de caseína, e outros, os quais contem vitaminas e aminoácidos, são usados como elementos- traços orgânicos, conforme apropriado.

20 O meio de cultura pode incluir outros componentes aditivos, tais como antibióticos, que são normalmente adicionados ao meio de cultura de microrganismos, em quantidades usualmente empregadas. É preferível adicionar uma quantidade apropriada de agente anti-espumante para 25 suprimir a formação de espuma durante a reação. As quantidades destes componentes no meio de cultura não são particularmente limitadas desde que as quantidades estejam dentro das faixas geralmente aplicadas no cultivo de *Escherichia coli*.

30 O meio de cultura a ser utilizado na presente invenção

é de preferência um meio líquido, tendo em consideração aplicação para produção industrial.

No presente método, o álcool isopropílico é de preferência coletado no estado de ser dissolvido numa solução de mistura do meio de cultura e da matéria-prima derivada de planta, ou no estado de ser dissolvido numa solução de retenção, dos pontos de vista de separação e razão de coleta. A solução de retenção pode ser, por exemplo, um solvente orgânico tal como tolueno ou dimetil formamida, ou água. Entre eles, a solução de retenção é de preferência água, com a qual os contaminantes voláteis gerados como subprodutos durante a produção de álcool isopropílico e o álcool isopropílico podem ser facilmente separados. Exemplos do método de coleta incluem o método descrito no pedido de WO 2009/008377.

Um exemplo de aparelhos aplicáveis ao método de produção de álcool isopropílico em que o álcool isopropílico pode ser coletado no estado de ser dissolvido na solução de retenção ou na mistura é o aparelho de produção mostrado na Fig. 1 do pedido de WO 2009/008377.

No aparelho de produção, um tubo de injeção para injetar um gás a partir do exterior do aparelho é conectado a um tanque de cultura que contém o meio de cultura que inclui a bactéria produtora de álcool isopropílico e a matéria-prima derivada de planta, permitindo assim aeração ao meio de cultura.

Um tanque de retenção que contém uma solução de retenção, como a solução de retenção está conectada ao tanque de cultura através de um tubo de conexão. Um gás ou líquido que se mover para o tanque de retenção contata a

solução de retenção, e o borbulhamento ocorre.

Como resultado, o álcool isopropílico, que foi produzido no tanque de cultura por cultivo sob aeração, é evaporado devido à aeração e, portanto, facilmente separado do meio de cultura, e é preso na solução de retenção no tanque de retenção. Como resultado, o álcool isopropílico pode ser produzido em um estado mais purificado de uma maneira simples e contínua.

#### EXEMPLOS

A seguir, exemplos da presente invenção são descritos, mas a invenção não é limitada aos mesmos. Na descrição, a "%" é baseada na massa salvo especificado o contrário.

[Exemplo 1]

(Construção de Vetor de Expressão para Gene Tiolase Derivado de *Escherichia Coli*, Gene CoA Transferase Derivado de *Escherichia Coli*, Gene Acetoacetato Descarboxilase Derivado de Bactéria do Gênero *Clostridium*, Gene Álcool Isopropílico Desidrogenase Derivado de Bactéria do Gênero *Clostridium* Gênero e Gene Invertase Derivado de *Escherichia coli* 0157, e Transformante com o Vetor de Expressão)

As sequências de aminoácidos de tiolase de *Escherichia coli* e CoA transferase de *Escherichia coli* e as sequências de bases dos genes dos mesmos já foram relatadas. Especificamente, o gene que codifica a tiolase está descrito em 2324131 a 2325315 da sequência de genoma da cepa de *Escherichia coli* MG1655 registrado com número de acesso U00096 no GenBank. Além disso, o gene que codifica a CoA transferase é descrito em 2321469 a 2322781 da sequência de genoma da cepa de *Escherichia coli* MG1655 mencionada acima.

A sequência promotora da um gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase derivado de *Escherichia coli* (a seguir algumas vezes referido como GAPDH) que é descrito em 397 a 440 na sequência base de informação do número de acesso 5 X02662 do GenBank pode ser utilizado como a sequência base de um promotor necessária para a expressão dos genes.

Para obter o promotor GAPDH, a amplificação foi realizada por um método de PCR utilizando o DNA genômico de cepa da *Escherichia coli* MG1655 como um modelo e usando 10 cgagctacatatgcaatgattgacacgattccg (Id. de Seq. N°: 1) e cgcgcgcatgctattgttagtgaataaaagg (Id. de Seq. N°: 2). O fragmento de DNA resultante foi digerido com as enzimas de restrição NdeI e SphI, como um resultado disto um fragmento de DNA de cerca de 100 bp correspondendo ao promotor GAPDH 15 foi obtido. O fragmento de DNA obtido foi misturado com um fragmento obtido pela digestão de um plasmídeo pBR322 (GenBank número de acesso J01749) com enzimas de restrição NdeI e SphI, e os fragmentos misturados foram ligados utilizando uma ligase. Posteriormente, uma célula 20 competente de cepa de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (DNA-903: Toyobo Co., Ltd.) foi transformada com o produto de ligação, e um transformante que cresceu em uma placa de agar LB contendo 50  $\mu$ g/mL de ampicilina foi obtido. A colônia obtida foi cultivada durante a noite a 37 °C em um 25 meio líquido LB contendo 50  $\mu$ g/mL de ampicilina, um plasmídeo foi recuperado a partir das células bacterianas obtidas, e foi confirmado que o promotor GAPDH foi inserido propriamente. O plasmídeo foi chamado de pBRgapP.

Para obter o gene do álcool isopropílico 30 desidrogenase, a amplificação foi realizada através de um

método de PCR utilizando o DNA genômico de *Clostridium beijerinckii* NRRL B-593 como um modelo e usando aatatgcatgctggtaacatatgaaagggtttcaatgctagg (Id. de Seq. N°: 3) e gcggatccggtacctataatataactactgcttaattaagtc (Id. de Seq. N°: 4). O fragmento de DNA resultante foi digerido com as enzimas de restrição SphI e BamHI, como um resultado disto um fragmento de álcool isopropílico desidrogenase de cerca de 1,1 kbp foi obtido. O fragmento de DNA obtido foi misturado com um fragmento obtido por digestão do pBRgapP previamente preparado com as enzimas de restrição SphI e BamHI e os fragmentos misturados foram ligados utilizando uma ligase. Posteriormente, uma célula competente de cepa de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (DNA-903: Toyobo Co., Ltd.) foi transformada com o produto de ligação, e um transformante que cresceu em uma placa de agar LB contendo 50  $\mu$ g/mL de ampicilina foi obtido. As colônias obtidas foram cultivadas durante a noite a 37 °C em um meio líquido LB contendo 50  $\mu$ g/mL de ampicilina, um plasmídeo foi recuperado a partir das células bacterianas obtidas, e foi confirmado que a álcool isopropílico desidrogenase foi propriamente inserida. O plasmídeo foi chamado de pGAP-IPAdh.

Para obter o gene tiolase derivado de *Escherichia coli*, a amplificação foi realizada por um método de PCR utilizando o DNA genômico de cepa de *Escherichia coli* MG1655 como um modelo e usando atggatccgctggtaacatatgaaaaatttgtcatcgtag (Id. de Seq. N°: 5) e gcagaagcttgtctagattaattcaaccgttcaatcaccatc (Id. de Seq. N°: 6). O fragmento de DNA resultante foi digerido com as enzimas de restrição BamHI e HindIII, como um resultado disto um fragmento de tiolase cerca de 1,2 kbp foi obtido.

O fragmento de DNA obtido foi misturado com um fragmento obtido pela digestão do plasmídeo pGAP-IPAdh previamente preparado com as enzimas de restrição BamHI e HindIII, e os fragmentos misturados foram ligados utilizando uma ligase.

5 Posteriormente, uma célula competente de cepa de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (DNA-903: Toyobo Co., Ltd.) foi transformada com o produto de ligação, e um transformante que cresceu em uma placa de agar LB contendo 50  $\mu$ g/mL de ampicilina foi obtido. As colônias obtidas foram cultivadas  
10 durante a noite a 37 °C em um meio líquido LB contendo 50  $\mu$ g/mL de ampicilina, um plasmídeo foi recuperado a partir das células bacterianas obtidas, e foi confirmado que o gene tiolase foi propriamente inserido. O plasmídeo foi chamado de pGAP-IPAdh-atoB.

15 Para obter um gene CoA transferase subunidade  $\alpha$  derivado de *Escherichia coli*, a amplificação foi realizada através de um método de PCR utilizando o DNA genômico de cepa de *Escherichia coli* MG1655 como um modelo e usando gctcttagagctggtaacatatgaaaacaaaattgtgacattacaagac (Id. de Seq. N°: 7) e tagcaagcttctactcgagttatttgctctcctgtgaaacg (Id. de Seq. N°: 8). O fragmento de DNA resultante foi digerido com as enzimas de restrição XbaI e HindIII, como um resultado disto um fragmento de um CoA transferase subunidade  $\alpha$  de cerca de 600 bp foi obtido. O fragmento de  
20 DNA obtido foi misturado com um fragmento obtido pela digestão do plasmídeo previamente preparado pGAP-IPAdh-atoB com as enzimas de restrição XbaI e HindIII, e os fragmentos misturados foram ligados utilizando uma ligase.  
25 Posteriormente, uma célula competente de cepa de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (DNA-903: Toyobo Co., Ltd.) foi

transformada com o produto de ligação, e um transformante que cresceu em uma placa de Agar LB contendo 50 µg/mL de ampicilina foi obtido. As colônias obtidas foram cultivadas durante a noite a 37 °C em um meio líquido LB contendo 50 µg/mL de ampicilina, um plasmídeo foi recuperado a partir das células bacterianas obtidas, e foi confirmado que o gene CoA transferase subunidade α foi inserido propriamente. O plasmídeo foi nomeado de pGAP-IPAdh-atoB-atoD.

Além disso, para obter um gene CoA transferase subunidade β derivado de *Escherichia coli*, a amplificação foi realizada por um método de PCR utilizando o DNA genômico de cepa de *Escherichia coli* MG1655 como um modelo e usando aagtctcgagctggtggAACATATggatgcgaaacaacgtattg (Id. de Seq. N°: 9) e ggccaagcttcataaatccccgttgc (Id. de Seq. N°: 10). O fragmento de DNA resultante foi digerido com as enzimas de restrição XhoI e HindIII, como um resultado disto um fragmento de CoA transferase subunidade β de cerca de 600 bp foi obtido. O fragmento de DNA obtido foi misturado com um fragmento obtido pela digestão do plasmídeo previamente preparado pGAP-IPAdh-atoB-atoD com as enzimas de restrição XhoI e HindIII, e os fragmentos misturados foram ligados utilizando uma ligase. Posteriormente, uma célula competente de cepa de *Escherichia coli* DH5α (DNA-903: Toyobo Co., Ltd.) foi transformada com o produto de ligação, e um transformante que cresceu em uma placa de agar LB contendo 50 µg/ml de ampicilina foi obtido. As colônias obtidas foram cultivadas durante a noite a 37 °C em um meio líquido LB contendo 50 µg/ml de ampicilina, um plasmídeo foi recuperado a partir

das células bacterianas obtidas, e foi confirmado que o gene da CoA transferase subunidade  $\beta$  foi propriamente inserido. O plasmídeo foi chamado de pGAP-IPAdh-atoB-atoD-atoA.

5       Além disso, para obter o cscA derivado da cepa de *Escherichia coli* 0157, a amplificação foi realizada por um método de PCR utilizando o DNA genômico de cepa de *Escherichia coli* 0157 como um modelo e usando gctgggtggaacatatatgacgcaatctcgattgcatt (Id. de Seq. N°: 11) e  
10 ttaaccaggatgccagagtgc (Id. de Seq. N°: 12). O fragmento de DNA resultante foi fosforilado no seu terminal utilizando a T4 polinucleótideo quinase, como um resultado disto um fragmento cscA de cerca de 1470 bp foi obtido. O fragmento de DNA obtido foi misturado com um fragmento obtido pela  
15 digestão do pGAP-IPAdh-atoB-ATOD-atoA anteriormente preparado com uma enzima de restrição HindIII, seguido por conversão para extremidades abruptas usando T4 DNA polimerase, e desfosforilação dos terminais com fosfatase alcalina . Os fragmentos misturados foram ligados  
20 utilizando uma ligase. Uma célula competente de cepa de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (DNA-903: Toyobo Co \*, Ltd.) foi transformada com o produto de ligação, e um transformante que cresceu em uma placa de Agar LB contendo 50  $\mu$ g/mL de ampicilina foi obtido. Um plasmídeo foi recuperado a partir  
25 das células bacterianas obtidas, e foi confirmado que o lado da extremidade 3' do gene CoA transferase subunidade  $\beta$  foi ligado ao lado da extremidade 5' do cscA, e que o cscA foi propriamente inserido. O plasmídeo foi chamado de pGAP-IPAdh-atoB-ATOD-atoA-cscA.

30       O genoma da *Escherichia coli* 0157 está disponível no

Instituto para Referência de Materiais e Medidas.

Para obter um gene acetoacetato descarboxilase, a amplificação foi realizada por um método de PCR utilizando o DNA genômico de *Clostridium acetobutylicum* ATCC824 como 5 um modelo e usando caggtaccgctggtaacatatgttaaggatgaagtaatcaaacaattgc (Id. de Seq. N°: 13) e gcggatccttacttaagataatcatatataacttcagc (Id. de Seq. N°: 14). O fragmento de DNA resultante foi digerido com as enzimas de restrição KpnI e BamHI, como um 10 resultado disto um fragmento de acetoacetato descarboxilase de cerca de 700 bp foi obtido. O fragmento de DNA obtido foi misturado com um fragmento obtido pela digestão do plasmídeo previamente preparado pGAP-IPAdh-atoB-atoD-atoA- 15 cscA com as enzimas de restrição KpnI e BamHI e os fragmentos mistos foram ligados utilizando uma ligase. Posteriormente, uma célula competente de cepa de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (DNA-903: Toyobo Co, Ltd.) foi transformada com o produto de ligação, e um transformante que cresceu em uma placa de Agar LB contendo 50  $\mu$ g/mL de 20 ampicilina. As colônias obtidas foram cultivadas durante a noite a 37 °C em um meio líquido LB contendo 50  $\mu$ g/mL de ampicilina, um plasmídeo foi recuperado a partir das células bacterianas obtidas, e foi confirmado que o gene acetoacetato descarboxilase foi propriamente inserido. O 25 plasmídeo foi chamado de pGAP-Iaaa-cscA. A cepa de *Escherichia coli* B (ATCC11303) foi transformada com o plasmídeo, e foi cultivada durante a noite a 37 °C em uma placa de Agar LB contendo 50  $\mu$ g/mL de ampicilina. O transformante resultante foi denominado de pGAP-Iaaa-cscA / 30 cepa B.

## [Exemplo 2]

(Produção de Álcool Isopropílico de Sacarose por Escherichia Coli pGAP-Iaaa-cscA/Cepa B Usando Tanque de Cultivo de 3 L)

5 Neste exemplo, o álcool isopropílico foi produzido usando um aparelho de produção mostrado na Fig. 1 do pedido de WO 2009/008377. O tanque de cultura utilizado foi um tanque com uma capacidade de 3 L e o tanque de retenção utilizado foi um tanque com uma  
10 capacidade de 10 L. A cultura tanque, o tanque de retenção, o tubo de injeção, o tubo de ligação, e o tubo de descarga foram todos feitos de vidro. No tanque de retenção, a água foi injetada como uma solução de retenção (água de retenção) em uma quantidade de 6 L. O tanque de cultura foi  
15 equipado com um tubo de drenagem, e o líquido de cultura aumentou pela alimentação de açúcar e um neutralizador foi descarregado para fora do tanque de cultura, conforme apropriado.

Como pré-cultura, a pGAP-Iaaa-cscA / cepa B obtida no  
20 Exemplo 1 foi inoculada em um frasco Erlenmeyer com a capacidade de 100 mL e contendo 25 mL de um caldo LB, líquido de cultura Miller (Difco 244620) contendo 50 µg/mL de ampicilina, e cultivadas durante a noite a uma temperatura da cultura de 35 °C enquanto se agitava a 120 rpm. A quantidade total do líquido de cultura foi transferida para um tanque de cultura tendo uma capacidade de 3 L (aparelho de cultura BMJ-01 fabricado pela ABLE Co., Ltd.) e contendo 1475 g de um meio de cultura tendo a seguinte composição, e foi cultivado.  
25

30 O cultivo foi realizado a uma quantidade de aeração de

1,5 L/min, uma velocidade de agitação de 550 rpm, uma temperatura da cultura de 35 °C, pH de 7,0 (ajustado com uma solução de NH<sub>3</sub>) sob pressão atmosférica. Uma solução aquosa de sacarose a 40% p/p foi adicionada a uma 5 velocidade de fluxo de 5 g/L/hora durante o período desde o início do cultivo até 8 horas após o início do cultivo, e, subsequentemente, a adição da solução aquosa de sacarose a 40 % p/p foi realizada a uma taxa de fluxo de 15 g/L/hora. Foram tiradas amostras do líquido de cultura bacteriana 48 10 horas após o início do cultivo, e as células bacterianas foram removidas por operação centrífuga. Depois disso, a quantidade de álcool isopropílico acumulado no sobrenadante da cultura resultante foi medida por HPLC de acordo com um método comum.

15 (Composição do Meio de Cultura)

Solução de maceração de milho (fabricado por Nihon Shokuhin Kako Co., Ltd.): 20 g/L

Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 0,09 g/L

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 2 g/L

20 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 2 g/L

MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 2 g/L

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 2 g/L

ADECANOL LG126 (Adeka Corporation): 0,6 g/L

(O resto: água)

25 Como resultado, em 48 horas após o início do cultivo, a acumulação de 5,9 g/L de álcool isopropílico foi confirmada. O valor medido é a soma dos montantes no líquido de cultura e na água de retenção (6 L) após o cultivo.

30 Os resultados demonstraram que a introdução de cscA

dentre o grupo de genes de sacarose não PTS resultou na decomposição de sacarose, e glicose e frutose, os quais são os produtos de decomposição, foram rapidamente incorporados nas células, e convertidos em álcool isopropílico.

5 [Exemplo 3]

A produção de álcool isopropílico a partir de sacarose foi testada em um caso em que as expressões dos genes CoA transferase (*atoD* e *atoA*) e um gene tiolase (*atoB*) no genoma da *Escherichia coli* hospedeira foram intensificados enquanto que o tamanho do DNA do comprimento do plasmídeo inteiro foi reduzido por ligação de apenas um gene acetoacetato descarboxilase, um gene da álcool isopropílico desidrogenase, e *cscA* ao vetor do plasmídeo a ser introduzido.

15 (Substituição do Promotor *atoD* no genoma da cepa de *Escherichia coli* B pelo Promotor GAPDH)

A sequência de base inteira do DNA genômico da cepa de *Escherichia coli* MG1655 é conhecida (número de acesso U00096 do GenBank), e a sequência de base de um gene (a seguir, por vezes abreviado para *atoD*) que codifica uma CoA transferase subunidade  $\alpha$  cepa de *Escherichia coli* MG1655 tem também sido relatado. Especificamente, *atoD* é descrito em 2321469 a 2322131 da sequência de genoma da cepa de *Escherichia coli* MG1655 registrada com número de acesso 25 U00096 no GenBank.

A sequência promotora de um gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase derivado de *Escherichia coli* (a seguir por vezes referido como GAPDH) que é descrito em 397 a 440 na informação da sequência de base número de acesso X02662 30 do GenBank pode ser utilizado como a sequência de base de

um promotor necessário para a expressão dos genes. A fim de obter o promotor GAPDH, a amplificação foi realizada através de um método de PCR utilizando o DNA genômico de cepa de *Escherichia coli* MG1655 como um modelo e usando 5 cgctcaattgcaatgattgacacgattccg (Id. de Seq. N°: 15) e acagaattcgctattgttagtgaataaaagg (Id. de Seq. N°: 16). O fragmento de DNA resultante foi digerido com as enzimas de restrição MfeI e EcoRI, como um resultado disto um fragmento de DNA de cerca de 100 bp que codifica um 10 promotor GAPDH foi obtido. O fragmento de DNA obtido foi misturado com um fragmento obtido pela digestão de um plasmídeo pUC19 (número de acesso X02514 no GenBank) com enzima de restrição EcoRI seguido por tratamento com fosfatase alcalina, e os fragmentos misturados foram 15 ligados utilizando uma ligase. Depois disso, uma célula competente cepa de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (DNA-903: Toyobo Co., Ltd.) foi transformada com o produto de ligação, e um transformante que cresceu em uma placa de agar LB contendo 50  $\mu$ g/mL 20 de ampicilina foi obtido. Dez das colônias obtidas foram individualmente cultivadas a 37 °C durante a noite em um meio líquido LB contendo 50  $\mu$ g/mL de ampicilina, os plasmídeos foram recuperados, e os plasmídeos a partir dos quais o promotor GAPDH não foi cortado quando digeridos com 25 as enzimas de restrição EcoRI e KpnI foram selecionados. Além disso, as sequências de DNA dos mesmos foram checadas, e um plasmídeo no qual o promotor GAPDH estava inserido propriamente foi nomeado pUCgapP. O pUCgapP obtido foi digerido com as enzimas de restrição EcoRI e KpnI.

30 Além disso, a fim de obter atoD, a amplificação foi

realizada por um método de PCR utilizando o DNA genômico de cepa de *Escherichia coli* MG1655 como um modelo e usando cgaattcgctggtaacatatatgaaaacaaaattgtgatgacattacaagac (Id. de Seq. N°: 17) e gcggtaccttatttgctctcctgtgaaacg (Id. de Seq. N°: 18). O fragmento de DNA resultante foi digerido com as enzimas de restrição EcoRI e KpnI, como um resultado do qual um fragmento atoD de cerca de 690 bp foi obtido, o fragmento de DNA foi misturado com o pUCgapP, que tinha sido previamente digerido com as enzimas de restrição EcoRI e KpnI, e os fragmentos misturados foram ligados utilizando uma ligase. Posteriormente, uma célula competente de cepa de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (DNA-903: Toyobo Co., Ltd.) foi transformada com o produto de ligação, e um transformante que cresceu em uma placa de agar LB contendo 50  $\mu$ g/ml de 15 ampicilina foi obtido. Um plasmídeo foi recuperado a partir das células bacterianas obtidas, e foi confirmado que ATOD foi propriamente inserido. O plasmídeo obtido foi denominado de pGAPatoD.

A cepa de *Escherichia coli* MG1655 está disponível a 20 partir da American Type Culture Collection.

Conforme descrito acima, a sequência de base de atoD no DNA genômico de cepa de *Escherichia coli* MG1655 foi também relatada. A PCR foi realizada utilizando o DNA genômico de cepa de *Escherichia coli* MG1655 como um modelo, 25 e usando gctcttagatgctgaaatccactagtcttgtc (Id. de Seq. N°: 19) e tactgcagcggtccagcaccttatcaacc (Id. de Seq. N°: 20) preparadas com base na informação do gene de uma região próxima a 5' de atoD de cepa de *Escherichia coli* MG1655, como um resultado do qual um fragmento de DNA de cerca de 30 1,1 kbp foi amplificado.

Além disso, a PCR foi realizada utilizando o vetor de expressão previamente preparado pGAPatoD como um modelo e usando ggtcttagagcaatgattgacacgattccg (Id. de Seq. N°: 21) preparadas com base na informação da sequência do promotor de GAPDH de cepa de *Escherichia coli* MG1655 e do iniciador de Id. de Seq. N°: 18 preparado com base na informação da sequência de atoD de cepa de *Escherichia coli* MG1655, como um resultado do qual um fragmento de DNA de cerca de 790 bp possuindo o promotor GAPDH e atoD foi obtido.

Os fragmentos obtidos acima foram digeridos com as enzimas de restrição PstI e XbaI, e XbaI e KpnI, respectivamente. Os fragmentos digeridos foram misturados com um fragmento obtido por digestão de um plasmídeo pTH18cs1 sensível à temperatura (GenBank número de acesso AB019610) [Hahimoto-Gotoh, T., Gene, 241, 185-191 (2000)], com PstI e KpnI, e os fragmentos misturados foram ligados utilizando uma ligase. Uma cepa DH5 $\alpha$  foi transformada com o produto de ligação, e um transformante que cresceu a 30 °C em uma placa de Agar LB contendo 10  $\mu$ g/mL de cloranfenicol foi obtido. A colônia obtida foi cultivada durante a noite a 30 °C em uma placa de Agar LB contendo 10  $\mu$ g/mL de cloranfenicol e um plasmídeo foi recuperado a partir das células bacterianas obtidas. A cepa de *Escherichia coli* B (ATCC11303) foi transformada com o plasmídeo obtido, e foi cultivada durante a noite a 30 °C em uma placa de Agar LB contendo 10  $\mu$ g/mL de cloranfenicol e um transformante foi obtido. O transformante obtido foi inoculado em uma placa de Agar LB contendo 10  $\mu$ g/mL de cloranfenicol, e cultivado durante a noite a 30 °C. As células de cultura de bactérias obtidas foram aplicadas sobre uma placa de Agar LB contendo

10 µg/mL de cloranfenicol, e foram cultivados a 42 °C, e as colônias foram obtidas. As colônias obtidas foram cultivadas a 30 °C durante 2 horas em um meio líquido LB não contendo um antibiótico, e aplicada sobre uma placa de 5 Agar LB contendo um antibiótico, como um resultado disto as colônias que crescem a 42 °C foram obtidas.

Das colônias resultantes, 100 colônias foram escolhidas aleatoriamente, cada uma das quais foi então cultivada em uma placa de Agar LB livre de antibiótico e de 10 uma placa de Agar LB contendo 10 µg/mL de cloranfenicol. Clones sensíveis ao Cloranfenicol foram selecionados e, a partir dos DNAs cromossômicos dos clones selecionados, um fragmento de cerca de 790 bp incluindo o promotor GAPDH e atoD foi amplificado por PCR e uma cepa, na qual uma região 15 promotora atoD foi substituída pelo promotor GAPDH, foi selecionada. Em seguida, um clone satisfazendo as condições acima foi chamado de uma cepa de *Escherichia coli* B cepa atoD-excluído GAPP-atoD genoma inserido.

A cepa de *Escherichia coli* B (ATCC11303) está 20 disponível na American Type Culture Collection, que é um banco de células, microorganismos, e genes.

[Exemplo 4]

(Construção de Vetor de Expressão para Gene Acetoacetato Descarboxilase Derivado de Bactéria do Gênero 25 *Clostridium* e Gene Álcool Isopropílico Desidrogenase Derivado de Bactéria do Gênero *Clostridium* e Transformante com o Vetor de Expressão)

Uma acetoacetato descarboxilase de uma bactéria do 30 gênero *Clostridium* é descrito no número de acesso M55392 no GenBank e uma álcool isopropílico desidrogenase da mesma é

descrita no número de acesso AF157307 no GenBank.

Para obter o gene álcool isopropílico desidrogenase, a amplificação foi realizada por um método de PCR usando o DNA genômico de *Clostridium beijerinckii* NRRLB-593 como um

5 modelo e usando

AATATGCATGCTGGTGGAACATATGAAAGGTTTGCAATGCTAGG (Id. de Seq.

Nº: 3) e gcggatccttataatataactactgcttaattaagtc (Id. de

Seq. Nº: 22). O fragmento de DNA resultante foi digerido

com as enzimas de restrição SphI e BamHI, como um resultado

10 disto um fragmento de álcool isopropílico desidrogenase de

cerca de 1,1 kbp foi obtido. O fragmento de DNA obtido foi

misturado com um fragmento obtido pela digestão do

plasmídeo previamente preparado pBRgapP com as enzimas de

restrição SphI e BamHI e os fragmentos mistos foram ligados

15 utilizando uma ligase. Posteriormente, uma célula

competente de cepa de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (DNA-903:

Toyobo Co., Ltd.) foi transformada com o produto de

ligação, e um transformante que cresceu em uma placa de

agar LB contendo 50  $\mu$ g/mL de ampicilina foi obtido. A

20 colônia obtida foi cultivada a 37 °C durante a noite em um

meio líquido LB contendo 50  $\mu$ g/mL de ampicilina, e um

plasmídeo foi recuperado a partir das células bacterianas

obtidas, e foi confirmado que o IPAdh foi propriamente

inserido. O plasmídeo foi chamado de pGAP-IPAdh.

25 Para obter o gene acetoacetato descarboxilase, a

amplificação foi realizada por um método de PCR utilizando

o DNA genômico de *Clostridium acetobutylicum* ATCC824 como

um modelo e usando

caggatccgctggAACATATgttaaggatgaagttaattaaacaaattgc (Id.

30 de Seq. Nº: 23) e

ggaattcggtaccttacttaagataatcatatataacttcagg (Id. de Seq. N°: 24). O fragmento de DNA resultante foi digerido com as enzimas de restrição BamHI e EcoRI, como um resultado disso um fragmento de acetoacetato descarboxilase de cerca de 700 5 bp foi obtido. O fragmento de DNA obtido foi misturado com um fragmento obtido pela digestão do plasmídeo previamente preparado pGAP-IPAdh com enzimas de restrição BamHI e EcoRI, e os fragmentos misturados foram ligados utilizando uma ligase. Uma célula competente de cepa de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (DNA-903: Toyobo Co., Ltd.) foi transformada com o produto de ligação, e um transformante que cresceu em uma placa de agar LB contendo 50  $\mu$ g/mL de ampicilina foi obtido. A colônia obtida foi cultivada a 37 °C durante a noite em um meio líquido LB contendo 50  $\mu$ g/mL de 10 ampicilina. Um plasmídeo foi recuperado a partir das 15 células bacterianas obtidas, e foi confirmado que o adc foi propriamente inserido. O plasmídeo foi chamado de pGAP-Ia.

Uma célula competente de uma cepa de *Escherichia coli* B cepa atoD-excluído GAPp-atoD genoma inserido preparada no 20 Exemplo 3 foi transformada com o plasmídeo pGAP-Ia, e foi cultivada a 37 °C durante a noite em uma placa de agar LB contendo 50  $\mu$ g/mL de ampicilina, como um resultado do qual uma cepa de *Escherichia coli* pGAP-Ia/GAPp-atoD genoma-inserido foi obtida.

25 O *Clostridium acetobutylicum* ATCC824 e a cepa de *Escherichia coli* B estão disponíveis a partir da American Type Culture Collection, que é um banco de células, microorganismos, e genes. O *Clostridium beijerinckii* NRRL B-593 está disponível a partir da Culture Collection VTT, 30 que é um banco de células e de microorganismos.

## [Exemplo 5]

(Construção de Vetor de Expressão de Gene de Acetoacetato Descarboxilase Derivado de Bactéria do Gênero *Clostridium*, Gene Álcool Isopropílico Desidrogenase 5 Derivado de Bactéria do Gênero *Clostridium*, e Gene Invertase Derivado de *Escherichia coli* 0157, e Transformante com o Vetor de Expressão)

A sequência de base inteira do DNA genômico da cepa de *Escherichia coli* 0157 é conhecida (número de acesso 10 AE005174 do GenBank), e a sequência de base de um gene (a seguir, por vezes abreviado para cscA) que codifica a invertase da cepa de *Escherichia coli* 0157 foi também relatada. Especificamente, o cscA é descrito em 3274383 a 3275816 da seqüência de genoma de cepa de *Escherichia coli* 15 0157 registrado com número de acesso GeBank AE005174 no GenBank.

Para obter o cscA, a amplificação foi realizada por um método de PCR utilizando o DNA genômico de cepa de *Escherichia coli* 0157 como um modelo e usando 20 ATGGTACCGCTGGTGGAACATATGACGCAATCTCGATTGCATG (Id. de Seq. N°:25) e CGAATTCTTAACCCAGTTGCCAGAGTGC (Id. de Seq. N°: 26). O fragmento de DNA resultante foi digerido com as enzimas de restrição KpnI e EcoRI, como resultado disso um fragmento de cscA de cerca de 1470 bp foi obtido. O 25 fragmento de DNA foi misturado com um fragmento obtido pela digestão do pGAP-Ia, que tinha sido previamente preparado no Exemplo 4 (o vetor de expressão para o gene acetoacetato descarboxilase derivado da bactéria do gênero *Clostridium* e o gene da álcool isopropílico desidrogenase derivado da 30 bactéria do gênero *Clostridium*), com as enzimas de

restrição KpnI e EcoRI, e os fragmentos mistos foram ligados utilizando uma ligase. Posteriormente, uma célula competente de cepa de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (DNA-903: Toyobo Co., Ltd.) foi transformada com o produto de ligação, e um transformante que cresceu em uma placa de agar LB contendo 50  $\mu$ g/mL de ampicilina foi obtido. Um plasmídeo foi recuperado a partir das células bacterianas obtidas, e foi confirmado que cscA foi propriamente inserido. Este plasmídeo foi chamado de pGAP-Ia-cscA.

Uma célula competente de cepa de *Escherichia coli* B cepa atoD-excluído GAPp-atoD genoma inserido preparada no Exemplo 3 foi transformada com o plasmídeo pGAP-Ia-cscA, e foi cultivada a 37 °C durante a noite em uma placa de agar LB contendo 50  $\mu$ g/mL de ampicilina, como resultado do qual uma cepa de *Escherichia coli* pGAP-Ia-cscA/GAPp-atoD genoma inserida foi obtida.

O genoma de *Escherichia coli* 0157 está disponível no Instituto de Materiais e Medição de Referência.

[Exemplo 6]

(Produção de Álcool Isopropílico a Partir de Sacarose pela Cepa de *Escherichia coli* pGAP-Ia-cscA/GAPp-atoD Genoma Inserido Usando Tanque de Cultura de 3 L)

Usando a cepa de *Escherichia coli* pGAP-Ia-cscA/GAPp-atoD genoma inserido obtida no Exemplo 5, a produção de álcool isopropílico foi examinada da mesma forma tal como no Exemplo 2.

Além disso, as quantidades de sacarose, glicose, e frutose acumuladas no tanque de cultura foram mensuradas, e os resultados são mostrados na Tabela 1.

Como resultado, 48 horas após o início do cultivo, foi

observado um acúmulo de 31,4 g/L de álcool isopropílico. Cada um dos valores mensurados é uma soma das quantidades presentes no líquido de cultura e da água de retenção após o cultivo.

5 [Tabela 1]

Tempo (h)	Quantidade adicionada de sacarose (g/L)	Açúcar residual			Quantidade acumulada de álcool isopropílico (g/L)
		Sacarose (g/L)	Glicose (g/L)	Frutose (g/L)	
0	0,0	0,00	0,00	0,00	0,00
3	23,6	22,07	0,00	0,00	0,00
6	67,2	46,05	0,02	0,03	0,43
10	152,1	78,28	0,76	0,00	6,43
24	384,6	0,00	0,00	0,00	11,87
30	536,0	0,00	0,00	0,00	18,28
48	1011,9	0,00	0,00	0,00	31,38

Os resultados demonstraram que, quando genes derivados de uma bactéria/bactérias do gênero *Clostridium* foram selecionados para atividade acetoacetato descarboxilase e para atividade álcool isopropílico desidrogenase, e estes 10 genes foram introduzidos com somente cscA dentro o grupo de genes de sacarose não PTS, a sacarose foi decomposta, e a glicose e a frutose como produtos da decomposição foram rapidamente incorporadas para dentro das células, e convertidas em álcool isopropílico. Ainda, nos resultados, 15 embora a glicose e a frutose devessem ter sido produzidas em quantidades equimolares a partir da decomposição da sacarose, a frutose não acumulou no meio de cultura, e foi observado que o álcool isopropílico foi eficientemente

produzido sem ser afetado pela repressão catabólica pela glicose.

[Exemplo 7]

(Produção de Álcool Isopropílico a Partir do Melaço 5 pela Cepa de *Escherichia coli* pGAP-Ia-cscA/GAPP-atoD Genoma Inserido Usando Tanque de Cultura de 1 L)

A produção de álcool isopropílico foi testada da mesma maneira que no exemplo 6, exceto pelo uso de um melaço 80% p/p (fabricado por Dai-Nippon Meiji Sugar Co., Ltd.) ao 10 invés de uma solução aquosa de sacarose 40% p/p. Após 48 horas do inicio do cultivo, foi observado um acúmulo de 29.4 g/L de álcool isopropílico. O valor mensurado é a soma das quantidades presentes no líquido de cultura e na água de retenção após o cultivo.

15 [Exemplo comparativo 1]

(Produção de Álcool Isopropílico Pela Cepa de *Escherichia coli* pGAP-Ia-cscA/ GAPP-atoD Genoma Inserido Usando Tanque de Cultura de 3 L)

O cultivo com álcool isopropílico foi testado em 20 relação à cepa pGAP-Ia-cscA/GAPP-atoD genoma inserido preparada no exemplo 4, sob as mesmas condições do exemplo 2. Como resultado, a produção de álcool isopropílico não foi confirmada mesmo após 48 horas, e a sacarose adicionada manteve-se no sobrenadante da cultura praticamente na mesma 25 quantidade.

Isso demonstra que o álcool isopropílico não pode ser produzido sem a introdução de cscA mesmo quando a habilidade de produzir álcool isopropílico foi transmitida.

[Exemplo comparativo 2]

30 (Produção de Álcool Isopropílico Pela cepa de

*Escherichia coli* pGAP-Ia-cscA/B Usando um Tanque de Cultura de 3 L)

A cepa de *Escherichia coli* B (ATCC11303) foi transformada com o plasmídeo pGAP-Ia-cscA preparado no exemplo 5, e foi cultivada a 37°C durante a noite em uma placa de Agar LB contendo 50 µg/mL de ampicilina. O transformante resultante foi chamado de cepa pGAP-Ia-cscA/B. O cultivo com álcool isopropílico foi testado em relação a cepa preparada pGAP-Ia-cscA/B, sob as mesmas condições do exemplo 2. Após 48 horas, não foi observada a produção de álcool isopropílico.

Isso demonstra que o álcool isopropílico não pode ser produzido a menos que a habilidade de produção de álcool isopropílico seja transmitida, mesmo quando CscA sozinho é introduzido na cepa de *Escherichia coli* B.

[Exemplo comparativo 3]

(Confirmação da Repressão Catabólica Pela Glicose na Cepa de *Escherichia coli* B)

A cepa B, que é a hospedeira de uma *Escherichia coli* produtora de álcool isopropílico de acordo com a presente invenção, foi confirmada ser a *Escherichia coli* que é intrinsecamente influenciada pela repressão catabólica pela glicose.

Como pré-cultura, a cepa de *Escherichia coli* B (ATCC11303) foi inoculada em um tubo plástico tendo uma capacidade de 14 mL (2057 fabricado por FALCON Co., Ltd.) e contendo 5 mL de caldo LB, líquido de cultura Miller (Difco 244620), e foi cultivada a uma temperatura de cultura de 37°C com agitação de 120 rpm. Então, 0,3 mL do líquido de pré-cultura foi transferido para cada um dos frascos tendo

a capacidade de 100 mL e contendo 30 mL de meio de cultura das composições 1 a 4 mostradas na tabela 2, respectivamente, e cultivadas. O cultivo foi realizado com uma velocidade de agitação de 120 rpm e a temperatura de cultura foi 37°C.

Em 0, 2, 4, 6, 8, e 10 horas após o início do cultivo, foram retiradas amostradas dos líquidos de cultura das células bacterianas, a partir dos quais as células bacterianas foram removidas por operação de centrifugação. 10 Então, os conteúdos de glicose e frutose resultantes no sobrenadante da cultura foram medidos por um Kit-F glicose/frutose (número do produto: 139106 fabricado por J.K. International Co.Ltd.). A figura 1 mostra os resultados. Na figura 1, os círculos pretos representam a 15 quantidade de redução de glicose e os círculos brancos representam a quantidade de redução de frutose, respectivamente. Além disso, o grau de redução de glicose ou frutose foi calculado para cada tempo de cultura começando por 0 hora de cultivo.

20 A Tabela 2 mostra as quantidades de redução de glicose no respectivo meio após 10 horas.

[Tabela 2]

	No.	1	2	3	4
Meio de cultura M9	NH <sub>2</sub> Cl <sub>4</sub> (g/L)	10	10	10	10
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -12H <sub>2</sub> O (g/L)	17,1	17,1	17,1	17,1
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)	3	3	3	3
	NaCl	0,5	0,5	0,5	0,5

	(g/L)				
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (mg/L)	490	490	490	490	
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O (mg/L)	14,7	14,7	14,7	14,7	
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (mg/L)	2,8	2,8	2,8	2,8	
Tiamina-HCl (mg/L)	10	10	10	10	
Açúcares	Glicose (g/L)	0	9	18	0
	Frutose (g/L)	0	9	0	18
(O resto: água)					
Quantidade de redução de glicose (g/L)	-	4,4	5,1	-	
Quantidade de redução de frutose (g/L)	-	1,0	-	3,4	

Como mostrado na tabela 2, quando se compara as quantidades de redução de frutose e glicose após 10 horas, o valor é de 3,4 g/L no caso do meio de cultura No.4 em que a fonte de açúcar inclui apenas frutose, enquanto que a captação de frutose é suprimida no caso do meio de cultura 5 2 em que o suprimento de açúcar inclui tanto glicose quanto frutose. Isto confirma que, quando o suprimento de açúcar é frutose sozinha, a cepa B incorpora frutose similarmente à incorporação da glicose, enquanto que a incorporação de 10 frutose na cepa B é suprimida quando glicose e frutose coexistem.

Assim, de acordo com a presente invenção, aqui

pode ser fornecido álcool isopropílico produzido por *Escherichia coli* e um método para produção de álcool isopropílico que é útil para a produção eficiente de álcool isopropílico a partir de sacarose, que não é caro e tem 5 alto valor de utilidade industrial.

A descrição do pedido de patente japonesa No. 2009-214694, depositada em 16 de setembro de 2009, é incorporada aqui em sua totalidade por referência.

Todas as publicações, pedidos de patentes, e 10 normas técnicas mencionados nessa especificação são aqui incorporados por referência na mesma extensão como se cada publicação individual, pedido de patente, ou norma técnica fosse especificamente e individualmente indicada para ser incorporada por referência.

### REIVINDICAÇÕES

1. *Escherichia coli* produtora de álcool isopropílico **caracterizada** por compreender apenas um gene de sacarose hidrolase (*cscA*) entre os genes que pertencem a um grupo de genes de sacarose não PTS, composto por um gene de proteína repressora (*cscR*), o gene da sacarose hidrolase (*cscA*), um gene da frutocinase (*cscK*) e um gene da sacarose permease (*cscB*), e um sistema de produção de álcool isopropílico fornecido ou aumentado,

em que o sistema de produção de álcool isopropílico fornecido ou aumentado é obtido por:

(i) introdução de um gene de acetoacetato descarboxilase tendo uma sequência de ácido nucleico de SEQ ID NO: 27, um gene de álcool isopropílico desidrogenase tendo uma sequência de ácido nucleico de SEQ ID NO: 28, um gene de CoA transferase tendo uma sequência de ácido nucleico de SEQ ID NO: 29 e um gene de tiolase tendo uma sequência de ácido nucleico de SEQ ID NO: 30; ou

(ii) introdução de um gene de acetoacetato descarboxilase tendo uma sequência de ácido nucleico de SEQ ID NO: 27 e um gene de álcool isopropílico desidrogenase tendo uma sequência de ácido nucleico de SEQ ID NO: 28, e a presença de um gene genômico de CoA transferase tendo uma sequência de ácido nucleico de SEQ ID NO: 29 e um gene genômico de tiolase tendo uma sequência de ácido nucleico de SEQ ID NO: 30 na *Escherichia coli* produtora de álcool isopropílico.

2. *Escherichia coli* produtora de álcool isopropílico, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que o gene da acetoacetato descarboxilase, o gene da álcool

isopropílico desidrogenase, e o gene da sacarose hidrolase foram introduzidos utilizando pelo menos um plasmídeo, e o gene da CoA transferase e o gene da tiolase são genes genômicos na hospedeira *Escherichia coli*.

3. *Escherichia coli* produtora de álcool isopropílico, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizada** pelo fato de que o promotor para expressar o gene da CoA transferase e o gene da tiolase ser pelo menos um promotor de gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase ou um promotor de serina hidroximetiltransferase.

4. Método para produzir álcool isopropílico **caracterizado** por compreender a produção de álcool isopropílico de uma matéria-prima derivada de planta contendo sacarose usando a *Escherichia coli* produtora de álcool isopropílico, conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 3.

Fig 1

