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

(11) PI 0923572-8 B1

(22) Data do Depósito: 23/12/2009

(45) Data de Concessão: 30/07/2019

(54) Título: ENZIMA TIOESTERASE MODIFICADA QUE CONVERTE UM SUBSTRATO ACIL-ACP C10, C12 OU C14 EM UM DERIVADO DE ÁCIDO GRAXO, POLINUCLEOTÍDEO CODIFICANDO A TIOESTERASE MODIFICADA, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA DE MICRORGANISMO E MÉTODO DE FABRICAÇÃO DE COMPOSIÇÃO DE DERIVADO DE ÁCIDO GRAXO C10, C12 OU C14

(51) Int.Cl.: C12N 9/18; C12N 15/31; C12N 15/55; C12N 15/63; C12P 7/64; (...).

(30) Prioridade Unionista: 23/12/2008 US 61/140,600.

(73) Titular(es): REG LIFE SCIENCES, LLC.

(72) Inventor(es): LOUIS HOM; NA TRINH; MURTAZA F. ALIBHAI.

(86) Pedido PCT: PCT US2009069356 de 23/12/2009

(87) Publicação PCT: WO 2010/075483 de 01/07/2010

(85) Data do Início da Fase Nacional: 22/06/2011

(57) Resumo: ENZIMA TIOESTERASE MODIFICADA QUE CONVERTE UM SUBSTRATO ACIL-ACP C10, C12 OU C14 EM UM DERIVADO DE ÁCIDO GRAXO, POLINUCLEOTÍDEO CODIFICANDO A TIOESTERASE MODIFICADA, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA DE MICROORGANISMO E MÉTODO DE FABRICAÇÃO DE COMPOSIÇÃO DE DERIVADO DE ÁCIDO GRAXO C10, C12 OU C14 A presente invenção se refere a enzimas inéditas de tioesterase mutante e equivalentes destas que ocorrem na natureza, composições feitas a partir de tais enzimas e usos das enzimas tioesterase. Em particular, a presente invenção provê enzimas tioesterase mutantes que apresentam propriedades alteradas, por exemplo, especificidade de substrato alterada, atividade alterada, seletividade alterada, e/ou produtividade proporcional alterada nas misturas de produto. A presente invenção também provê polinucleotídeos codificando tais enzimas tioesterase mutantes, e vetores e células hospedeiras contendo tais polinucleotídeos. A invenção adicionalmente provê usos inéditos de tioesterases na produção de vários derivados de ácido graxo, que são úteis como, ou como componentes de compostos químicos industriais e combustíveis.

ENZIMA TIOESTERASE MODIFICADA QUE CONVERTE UM SUBSTRATO ACIL-ACP C10, C12 OU C14 EM UM DERIVADO DE ÁCIDO GRAXO, POLINUCLEOTÍDEO CODIFICANDO A TIOESTERASE MODIFICADA, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA DE MICROORGANISMO E MÉTODO DE FABRICAÇÃO DE COMPOSIÇÃO DE DERIVADO DE ÁCIDO GRAXO C10, C12 OU C14

REFERÊNCIA CRUZADA COM PEDIDOS RELACIONADOS

Esse pedido reivindica o benefício da U.S. Provisional Application No. 61/140.600, depositada em 23 de dezembro de 2008, o conteúdo na íntegra do qual está aqui incorporado por referência.

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção se refere a composições de tioesterase inéditas, células hospedeiras inéditas contendo tioesterases, métodos inéditos de produção de derivados de ácido graxo, e derivados de ácido graxo produzidos por este método e usos do mesmo. Um aspecto particular da presente invenção se refere à produção de químicos e combustíveis industriais.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Desenvolvimentos em tecnologia têm sido acompanhados por um aumento na confiança em combustíveis e químicos industriais de fonte petroquímica. Tais fontes de combustível vêm se tornando cada vez mais limitada e difícil de adquirir. Com a queima de combustíveis fósseis acontecendo a uma taxa nunca antes obtida, é provável que a demanda mundial de combustível e químicos derivados de petroquímicos irá em breve superar os suprimentos

atuais.

Como resultado, esforços vêm sido direcionados para a busca de fontes de energia renovável, tais como luz solar, água, vento e biomassa. O uso de biomassa para produzir novas fontes de combustível e químicos que não são derivados de fontes de petróleo (*ex.*, biocombustível) surgiu como uma opção alternativa.

O biocombustível é biodegradável, combustível de combustão de queima limpa que pode ser constituído de alcanos e/ou ésteres. Um biocombustível exemplar é o biodiesel. O biodiesel pode ser utilizado na maioria dos motores a diesel de combustão interna tanto na forma pura, que é referido como biodiesel limpo, ou como uma mistura em qualquer concentração como diesel de petróleo comum ou outros biodieseis.

O biodiesel oferece um número de propriedades benéficas comparado ao diesel baseado em petróleo, incluindo redução de emissão (*ex.*, monóxido de carbono, enxofre, hidrocarbonos aromáticos, partículas de fuligem, etc.) durante a combustão. O biodiesel também mantém um ciclo de dióxido de carbono balanceado devido ao fato de ser baseado em materiais biológicos renováveis. O biodiesel é tipicamente completamente biodegradável, e apresenta um bom perfil de segurança devido a seu alto ponto de inflamação e baixa inflamabilidade relativos. Além disso, o biodiesel provê boas propriedades de lubrificação, com isso reduzindo o desgaste dos motores.

Métodos atuais de produção de biodiesel envolvem a transesterificação de triacilglicerídeos de matéria-prima de

óleo vegetal, tais como de colza na Europa, de soja na América do Norte e de óleo de palma no sudeste da Ásia. A produção de biodiesel em escala industrial é então geograficamente e sazonalmente restrita a áreas onde matérias-primas de óleo vegetal são produzidas. O processo de transesterificação leva a uma mistura de ésteres graxos que podem ser utilizados como biodiesel, porém também a um subproduto indesejado, a glicerina. Para serem utilizáveis como biodiesel, os ésteres graxos devem ser adicionalmente purificados a partir do produto heterogêneo. Isso aumenta os custos e a quantidade de energia requerida para a produção de éster graxo e, finalmente, pra a produção do biodiesel também. Além disso, matérias-primas de óleo vegetal são fontes ineficientes de energia devido ao fato delas requererem espaço extensivo para cultivo. Por exemplo, a produtividade do biodiesel de colza é somente 1300 L/hectare devido ao fato de somente o óleo da semente ser utilizado para a produção do biodiesel, e não o restante da biomassa de colza. Adicionalmente, o cultivo de algumas matérias primas de óleo vegetal, tais como colza e soja, requer a frequente rotação de culturas para prevenir a depressão de nutriente do solo.

PCT Publication No. WO 2007/136762 revela microorganismos recombinantes que são capazes de sintetizar produtos derivados a partir da via sintética de ácido graxo, incluindo, *inter alia*, ésteres de ácido graxo e álcoois graxos. Em particular, certos derivados de ácido graxo são descritos como apresentando comprimento de cadeia de carbono, níveis de ramificação e saturação definidos. A publicação '762 descreve células recombinantes que utilizam super-expressão endógena ou expressão heteróloga de proteínas tioesterase na produção de derivados de

ácido graxo.

PCT Publication No. WO 2008/119082 revela células e microorganismos geneticamente engenheirados que produzem produtos a partir da via biossintética de ácido graxo, incluindo, *inter alia*, ésteres de ácido graxo e álcoois graxos. A publicação '082 descreve células recombinantes que utilizam a super-expressão de enzimas acil-CoA sintetase para produzir mais eficientemente derivados de ácido graxo.

U.S. Patent No. 5.955.329 revela proteínas acil-ACP tioesterase de planta geneticamente engenheiradas apresentando especificidade de substrato alterada. Em particular, a patente '329 revela a produção de tioesterases acil-ACP de planta engenheiradas, caracterizada pelo fato das tioesterases acil-ACP de planta engenheiradas demonstrarem especificidade de substrato alterada no que diz respeito aos substratos acil-ACP hidrolisados pelas tioesterases de planta se comparado à tioesterase acil-ACP nativa.

Enquanto a arte precedente revela certas revelações úteis no que diz respeito à produção de certos derivados de ácido graxo, uma necessidade existe no campo para métodos e processos melhorados para produção mais econômica e eficiente de tais derivados de ácido graxo, e também para tecnologia facilitadora da produção de composições que apresentam especificações de produto alteradas. Como um exemplo específico, uma necessidade para a produção de composições de ácido graxo apresentando especificações e propriedades pré-desenhadas ou ajustadas para aplicações particulares tais como combustíveis, detergentes, lubrificantes, molécula precursora industrial e outras

aplicações valiosas de derivados de ácido graxo.

RESUMO DA INVENÇÃO

É um objeto da presente invenção a provisão de enzimas tioesterase úteis mutante e que ocorrem na natureza, polinucleotídeos codificando essas enzimas, vetores contendo os polinucleotídeos codificando as enzimas tioesterase úteis, células hospedeiras recombinantes contendo enzimas tioesterases mutadas endógenas, células hospedeiras recombinantes transformadas com os vetores, células hospedeiras recombinantes apresentando polinucleotídeos codificando enzimas tioesterases integrados nos cromossomos destas, tioesterases produzidas pela célula hospedeira, composições de derivados de ácido graxo (tais como químicos e biocombustíveis industriais) produzidas *in vitro* e/ou *in vivo*, métodos para produção de composições de derivados de ácido graxo *in vitro* e/ou *in vivo*, e métodos de utilização das composições de derivados de ácido graxo produzidas.

É um objeto da presente invenção a provisão de métodos de produção de composições de derivados de ácido graxo através de fermentações microbianas que apresentam um perfil de produto pré-determinado no que diz respeito a comprimento de cadeias de carbono e produtividades proporcionais. Essas composições são bem apropriadas para aplicações nas indústrias de combustível e químicos devido ao fato das suas propriedades pode ser ajustadas para as aplicações particulares para as quais elas são destinadas. Por exemplo, é possível ajustar um produto de éster graxo, de acordo com os métodos descritos aqui, de modo que ele pode ser utilizado como um combustível automotivo, e/ou desenhar uma composição que apresente, por exemplo, características de

combustível melhoradas tais como ponto de turvação, lubricidade, número de cetano, viscosidade cinemática, número de ácido, ponto de ebulição, estabilidade oxidativa, ponto de entupimento de filtro a frio, perfil de impureza, nível de cinza sulfatada e/ou ponto de inflamação. Similarmente, é possível produzir químicos industriais de acordo com os métodos descritos aqui que podem substituir químicos atuais que têm como fonte o petróleo, e que são ajustados para aplicações particulares, por exemplo, para a produção de álcoois graxos que são ajustados de maneira ideal para utilização como surfactantes e/ou detergentes.

É um objeto da invenção a provisão de métodos alternativos de produção de ésteres graxos sem a presença de (ou na ausência de) uma éster sintase. Esse método é energeticamente mais favorável que os métodos até agora revelados para produção de composições de éster graxo através de processos de fermentação microbiana, o qual requeria pelo menos tanto uma enzima tioesterase quanto uma enzima éster sintase. Desse modo, as tioesterases inéditas da invenção provêm vantagens adicionais.

Em uma concretização da invenção, tioesterases mutantes (ou equivalentes destas que ocorrem na natureza) são providas que derivam de uma tioesterase precursora, caracterizado pelo fato de cada um dos mutantes (ou os equivalentes que ocorrem na natureza) apresentam pelo menos uma propriedade alterada *in vitro* e/ou *in vivo*, quando comparada às propriedades da tioesterase precursora. A propriedade alterada pode ser, por exemplo, uma propriedade biofísica tais como estabilidade térmica (ponto de derretimento T_m); solvente, soluto, e/ou estabilidade oxidativa; lipofilicidade; hidrofilicidade;

estrutura quaternária; momento dipolo; e/ou ponto isoelétrico. A propriedade alterada pode também ser, por exemplo, uma propriedade bioquímica tais como pH ideal, temperatura ideal, e/ou força iônica ideal. A propriedade alterada pode ser adicionalmente, por exemplo, um parâmetro de enzima catalítica tal como distribuição de produto (incluindo, por exemplo, uma porcentagem ou produtividade proporcional maior ou menor para um produto particular X outros produtos na mistura de produto), atividade específica, preferência de substrato, afinidade de substrato, inibição de substrato, afinidade de produto, taxa de renovação ou taxa catalítica, inibição de produto, mecanismo de cinética, K_M, k_{cat}, k_{cat}/K_m, e/ou V_{Max}. A propriedade alterada pode adicionalmente ser, por exemplo, um aumento ou um decréscimo em atividade ou uma preferência alterada para alcólise X hidrólise, substratos de proteína carreadora acil-CoA X acil-acil, substratos éster X tioéster, substratos saturados X insaturados, substrato de cadeia simples X ramificada; alterações nas posições de insaturações, variações de números de cetano, ou comprimentos de cadeia de carbono específica, substratos ramificados, posição de ramificação, substratos hidróxi-acil, substratos ceto-acil; e/ou produtos com uma variação alterada de números de cetano específicos, taxa de octanagem, estabilidade oxidativa, lubricidade, ponto de inflamação, viscosidade, ponto de ebulição, ponto de derretimento, ponto de vazamento, ponto de turvação, ponto de entupimento de filtro a frio, característica de fluxo a frio, aromaticidade, e/ou número de iodo. Propriedades alteradas podem também incluir, por exemplo, um decréscimo na atividade ou uma atenuação de hidrólise de éster, de modo que a hidrólise de moléculas de produto desejado é reduzida ou

eliminada. Propriedades alteradas podem adicionalmente incluir, por exemplo, um decréscimo na toxicidade da proteína à célula e/ou uma alteração no nível de expressão da proteína na célula, quando comparado à toxicidade da proteína precursora à e/ou nível de expressão na mesma célula. Em uma concretização exemplar, uma propriedade alterada pode incluir uma alteração na habilidade de catalisação da síntese de derivados de acil graxo diretamente ou indiretamente *in vivo* ou *in vitro*. Em outra concretização exemplar, uma propriedade alterada é o melhoramento ou aumento da produtividade ou produtividade proporcional *in vitro* e/ou *in vivo* de um derivado de ácido graxo particularmente desejado.

Em uma concretização da invenção, uma tioesterase mutante (ou um equivalente deste que ocorre na natureza) é derivada a partir de uma tioesterase precursora. Em uma concretização particular da invenção, a tioesterase precursora é uma tioesterase que ocorre na natureza, uma tioesterase previamente modificada, ou uma tioesterase sintética.

Em uma concretização da invenção, a tioesterase mutante (ou uma equivalente desta que ocorre na natureza) é derivada a partir de um precursor que é uma tioesterase que ocorre na natureza. A tioesterase precursora que ocorre na natureza pode ser obtida a partir, por exemplo, de uma fonte vegetal, animal, bacteriana, fúngica, de levedura ou outra fonte microbiana. A tioesterase mutante (ou uma equivalente desta que ocorre na natureza) pode ser derivada a partir de uma tioesterase precursora de *Acidovorax, Acinetobacter, Aeromonas, Alcanivorax, Aliivibrio, Alkalilimnicola, Alteromonadales, Alteromonas, Aurantimonas, Azoarcus, Azorhizobium, Azotobacter, Beggiatoa, Beijerinckia,*

Bordetella, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Caulobacter*, *Cellvibrio*, *Chromobacterium*, *Citrobacter*, *Comamonas*, *Cupriavidus*, *Dechloromonas*, *Delftia*, *Desulfovibrio*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Geobacter*, *Hahella*, *Halorhodospira*, *Herminiimonas*, *Idiomarina*, *Janthinobacterium*, *Klebsiella*, *Leptospira*, *Leptothrix*, *Limnobacter*, *Magnetospirillum*, *Marinobacter*, *Marinomonas*, *Methylibium*, *Methylobacillus*, *Methylobacterium*, *Methylocella*, *Methylococcus*, *Moritella*, *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrosomonas*, *Nitrosospira*, *Oceanospirillum*, *Oligotropha*, *Pectobacterium*, *Photobacterium*, *Photorhabdus*, *Polaromonas*, *Proteus*, *Providencia*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Psychromonas*, *Ralstonia*, *Reinekea*, *Rhodobacterales*, *Rhodoferax*, *Rhodopseudomonas*, *Rhodospirillum*, *Saccharophagus*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shewanella*, *Shigella*, *Stenotrophomonas*, *Streptococcus*, *Thauera*, *Thioalkalivibrio*, *Thiobacillus*, *Vibrio*, *Xanthomonas*, ou *Yersinia*.

Em uma concretização particular, a tioesterase precursora da invenção pode ser derivada a partir de qualquer uma dentre *Acidovorax avenae subsp. citrulli AAC00-1*, *Acidovorax sp. JS42*, *Acinetobacter baumannii ACICU*, *Acinetobacter baumannii ATCC 17978*, *Aeromonas hydrophila subsp. Hydrophila ATCC 7966*, *Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida A449*, *Alcanivorax borkumensis SK2*, *Alcanivorax sp. DG881*, *Aliivibrio salmonicida LFI1238*, *Alkalilimnicola ehrlichei MLHE-1*, *alpha proteobacterium HTCC2255*, *Alteromonadales bacterium TW-7*, *Alteromonas macleodii deep ecotype*, *Aurantimonas sp. SI85-9A1*, *Azoarcus sp. BH72*, *Azorhizobium caulinodans ORS 571*, *Azotobacter vinelandii AvOP*, *Beggiatoa sp. PS*, *Beijerinckia indica subsp. indica ATCC*

9039, Bordetella avium 197N, Bordetella bronchiseptica RB50, Bordetella parapertussis 12822, Bordetella pertussis Tohama I, Bordetella petrii DSM 12804, Bradyrhizobium sp. BTAi1, Bradyrhizobium sp. ORS278, Burkholderia ambifaria AMMD, Burkholderia ambifaria IOP40-10, Burkholderia ambifaria MC40-6, Burkholderia ambifaria MEX-5, Burkholderia cenocepacia AU 1054, Burkholderia cenocepacia HI2424, Burkholderia cenocepacia J2315, Burkholderia cenocepacia MC0-3, Burkholderia cenocepacia PC184, Burkholderia dolosa AUO158, Burkholderia graminis C4D1M, Burkholderia mallei ATCC 23344, Burkholderia mallei GB8 horse 4, Burkholderia mallei NCTC 10229, Burkholderia multivorans ATCC 17616, Burkholderia oklahomensis C6786, Burkholderia oklahomensis EO147, Burkholderia phymatum STM815, Burkholderia pseudomallei 1106a, Burkholderia pseudomallei 1106b, Burkholderia pseudomallei 14, Burkholderia pseudomallei 1655, Burkholderia pseudomallei 1710b, Burkholderia pseudomallei 305, Burkholderia pseudomallei 406e, Burkholderia pseudomallei 668, Burkholderia pseudomallei 7894, Burkholderia pseudomallei K96243, Burkholderia pseudomallei NCTC 13177, Burkholderia sp. 383, Burkholderia thailandensis Bt4, Burkholderia thailandensis E264, Burkholderia thailandensis MSMB43, Burkholderia thailandensis TXDOH, Burkholderia ubonensis Bu, Burkholderia vietnamiensis G4, Caulobacter crescentus CB15, Cellvibrio japonicus Ueda107, Chromobacterium violaceum ATCC 12472, Chromohalobacter salexigens DSM 3043, Citrobacter koseri ATCC BAA-895, Comamonas testosteroni KF-1, Cupriavidus taiwanensis, Dechloromonas aromatica RCB, Delftia acidovorans SPH-1, Desulfovibrio desulfuricans subsp. desulfuricans str. G20, Desulfovibrio desulfuricans subsp. desulfuricans str. G20,

Enterobacter cancerogenus ATCC 35316, Enterobacter sakazakii ATCC BAA-894, Enterobacter sp. 638, Erwinia tasmaniensis, Escherichia albertii TW07627, Escherichia coli O157:H7 EDL933, Escherichia coli O157:H7 str.EC4024, Escherichia coli O157:H7 str. EC4196, gamma proteobacterium HTCC5015, gamma proteobacterium KT 71, Geobacter sp. M21, Hahella chejuensis KCTC 2396, Halorhodospira halophila SL1, Herminiimonas arsenicoxydans, Idiomarina baltica OS145, Idiomarina loihiensis L2TR, Janthinobacterium sp. Marseille, Klebsiella pneumoniae 342, Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae MGH 78578, Klebsiella sp. ZD414, Leptospira interrogans serovar Copenhageni str. Fiocruz L1-130, Leptospira interrogans serovar Lai str. 56601, Leptothrix cholodnii SP-6, Limnobacter sp. MED105, Magnetospirillum magneticum AMB-1, marine gamma proteobacterium HTCC2080, marine gamma proteobacterium HTCC2143, marine gamma proteobacterium HTCC2207, marine metagenome, Marinobacter algicola DG893, Marinobacter aquaeolei VT8, Marinobacter sp. ELB17, Marinomonas sp. MWYL1, Methylibium petroleiphilum PM1, Methylobacillus flagellatus KT, Methylobacterium chloromethanicum CM4, Methylobacterium extorquens PA1, Methylobacterium populi BJ001, Methylocella silvestris BL2, Methylococcus capsulatus str. Bath, Moritella sp. PE36, Nitrobacter sp. Nb-311A, Nitrobacter winogradskyi Nb-255, Nitrococcus mobilis Nb-231, Nitrosococcus oceani ATCC 19707, Nitrosococcus oceani C-27,Nitrosomonas europaea ATCC 19718, Nitrosomonas eutropha C91, Nitrosospira multiformis ATCC 25196, Oceanospirillum sp. MED92, Oligotropha carboxidovorans OM5, Pectobacterium atrosepticum SCRI1043, Photobacterium profundum 3TCK, Photobacterium profundum SS9, Photobacterium sp. SKA34,

Photorhabdus luminescens, Photorhabdus luminescens subsp. laumondii TTO1, Polaromonas naphthalenivorans CJ2, Polaromonas sp. JS666, Polynucleobacter sp. QLW-P1DMWA-1, Proteus mirabilis HI4320, Providencia stuartii ATCC 25827, Pseudoalteromonas atlantica T6c, Pseudoalteromonas haloplanktis TAC125, Pseudoalteromonas sp. 643A, Pseudoalteromonas tunicata D2, Pseudomonas aeruginosa PA7, Pseudomonas aeruginosa PACS2, Pseudomonas aeruginosa PAO1, Pseudomonas aeruginosa UCBPP-PA14, Pseudomonas entomophila L48, Pseudomonas fluorescens Pf0-1, Pseudomonas fluorescens Pf-5, Pseudomonas mendocina ymp, Pseudomonas putida F1, Pseudomonas putida GB-1, Pseudomonas putida KT2440, Pseudomonas putida W619, Pseudomonas stutzeri A1501, Pseudomonas syringae pv. Phaseolicola 1448A, Pseudomonas syringae pv. syringae B728a, Pseudomonas syringae pv. tomato str. DC3000, Psychromonas ingrahamii 37, Ralstonia eutropha H16, Ralstonia eutropha JMP134, Ralstonia metallidurans CH34, Ralstonia pickettii 12D, Ralstonia pickettii 12J, Ralstonia solanacearum GMI1000, Ralstonia solanacearum IPO1609, Ralstonia solanacearum MolK2, Ralstonia solanacearum UW551, Reinekea sp. MED297, Rhodobacterales bacterium Y4I, Rhodoferax ferrireducens T118, Rhodopseudomonas palustris BisA53, Rhodopseudomonas palustris BisB18, Rhodopseudomonas palustris BisB5, Rhodopseudomonas palustris CGA009, Rhodopseudomonas palustris HaA2, Rhodopseudomonas palustris TIE-1, Rhodospirillum centenum SW, Saccharophagus degradans 2-40, Salmonella enterica subsp. arizonae serovar 62:z4,z23:--, Salmonella enterica subsp. enterica serovar Choleraesuis str. SC-B67, Salmonella enterica subsp. enterica serovar allinarum str. 287/91, Salmonella enterica subsp. enterica serovar Hadar str.

RI_05P066, Salmonella enterica subsp. enterica serovar Javiana str. GA_MM04042433, Salmonella enterica subsp. enterica serovar Saintpaul str. SARA23, Salmonella enterica subsp. enterica serovar Saintpaul str. SARA29, Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi str. CT18, Salmonella typhimurium LT2, Serratia proteamaculans 568, Shewanella amazonensis SB2B, Shewanella baltica OS155, Shewanella baltica OS185, Shewanella baltica OS195, Shewanella baltica OS223, Shewanella benthica KT99, Shewanella denitrificans OS217, Shewanella frigidimarina NCIMB 400, Shewanella halifaxensis HAW-EB4, Shewanella loihica PV-4, Shewanella oneidensis MR-1, Shewanella pealeana ATCC 700345, Shewanella putrefaciens 200, Shewanella sediminis HAW-EB3, Shewanella sp. ANA-3, Shewanella sp. MR-4, Shewanella sp. MR-7, Shewanella sp. W3-18-1, Shewanella woodyi ATCC 51908, Shigella boydii Sb227, Shigella dysenteriae Sd197, Stenotrophomonas maltophilia K279a, Stenotrophomonas maltophilia R551-3, Streptococcus sp. (N1), synthetic construct, Thauera sp. MZ1T, Thioalkalivibrio sp. HL-EbGR7, Thiobacillus denitrificans ATCC25259, Thiomicrospira crunogena XCL-2, Vibrio alginolyticus 12G01, Vibrio angustum S14, Vibrio campbellii AND4, Vibrio cholerae 2740-80, Vibrio cholerae MZO-2, Vibrio cholerae O1 biovar eltor str. N16961, Vibrio cholerae V51, Vibrio fischeri ES114, Vibrio fischeri MJ11, Vibrio harveyi ATCC BAA-1116, Vibrio mimicus,Vibrionales bacterium SWAT-3, Vibrio parahaemolyticus AQ3810, Vibrio parahaemolyticus RIMD 2210633, Vibrio shilonii AK1, Vibrio splendidus 12B01, Vibrio sp. MED222, Vibrio vulnificus CMCP6, Vibrio vulnificus YJ016, Xanthomonas axonopodis pv. citri str. 306, Xanthomonas campestris pv. campestris str.ATCC 33913, Xanthomonas campestris pv. campestris

str. B100, Xanthomonas campestris pv. Vesicatoria str. 85-10, Xanthomonas oryzae pv. oryzae KACC10331, Xanthomonas oryzae pv. oryzae PXO99A, Xanthomonas oryzae pv. oryzicola BLS256, Yersinia bercovieri ATCC 43970, Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081,Yersinia frederiksenii ATCC 33641, Yersinia intermedia ATCC 29909,Yersinia mollaretii ATCC 43969, Yersinia pestis Angola, Yersinia pestis biovar Orientalis str. F1991016, Yersinia pestis CO92, Yersinia pestis KIM ou *Yersinia pseudotuberculosis IP 31758.*

Em uma concretização da invenção, a tioesterase precursora é uma tioesterase que apresenta uma sequência análoga àquela de 'TesA (*ex.*, uma enzima TesA sem o peptídeo sinal). Em uma concretização preferencial, a tioesterase precursora apresenta pelo menos por volta de 20%, por exemplo, pelo menos por volta de 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% identidade de sequência a 'TesA. Em ainda outro exemplo, a tioesterase precursora apresenta pelo menos por volta de 20%, por exemplo, pelo menos por volta de 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade de sequência a uma 'TesA que é obtida a partir de uma *E. coli.*, tal como uma *E.coli K12.* Em um exemplo adicional, a tioesterase precursora é uma tioesterase que apresenta uma sequência análoga à sequência de SEQ ID NO:31, e preferencialmente pelo menos por volta de 20%, por exemplo, pelo menos por volta de 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade de sequência com SEQ ID NO:31. A sequência análoga pode ser a partir de uma proteína que

ocorre na natureza ou pode ser proveniente de uma proteína previamente modificada.

Em uma concretização da invenção, a tioesterase precursora é uma tioesterase que contém a cadeia de aminoácidos:

G-D-S-L-X(5)-M (SEQ ID NO:28), caracterizado pelo fato de:

o "X" se referir a qualquer resíduo de aminoácido; o número em parêntese adjacente a ele, quando presente, se referir ao número de resíduos X na porção de resíduos de aminoácidos;

o resíduo S na posição 3 ser um resíduo catalítico;

o resíduo D na posição 2 poder ser substituído por N ou T;

o resíduo L na posição 4 poder ser substituído por C ou Q;

o resíduo M na posição 10 poder ser substituído por C, D, L, N, T, ou V;

e/ou

V-X(2)-G-X-N-D-X-L (SEQ ID NO:29), caracterizado pelo fato de:

cada "X" se referir a qualquer resíduo de aminoácido; o número em parêntese adjacente a ele, quando presente, se referir ao número de resíduos X na porção de resíduos de aminoácidos;

o resíduo N na posição 6 estar no buraco do oxiânion;

o resíduo V na posição 1 poder ser substituído por L;

o resíduo N na posição 6 poder ser substituído por V, L, C, A, G, H, I, T, ou W;

o resíduo D na posição 7 poder ser substituído por E;

o resíduo L na posição 9 poder ser substituído por I, W, F, T, M, A, E, N, ou V;

e/ou

D-X(2)-H-P-X(7)-I (SEQ ID NO:30), caracterizado pelo fato de:

cada "X" se referir a qualquer resíduo de aminoácido; cada número em parêntese adjacente a ele, quando presente, se referir ao número de resíduos X na porção respectiva de resíduos de aminoácidos;

os resíduos D e H nas posições 1 e 4 respectivamente serem os resíduos catalíticos;

o resíduo P na posição 5 poder ser substituído por G, A, F, L, S, ou V;

o resíduo I na posição 13 poder ser substituído por L ou V.

Em uma concretização da invenção, a tioesterase precursora é uma tioesterase apresentando reatividade imunológica cruzada com uma 'TesA obtida a partir de uma *E. coli*. Em uma concretização particular, a tioesterase precursora apresenta reatividade imunológica cruzada com a 'TesA obtida a partir de uma *E. coli K-12*. Em uma concretização particular, a tioesterase precursora apresenta reatividade imunológica cruzada com uma

tioesterase contendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:31. Em uma concretização particular, a tioesterase precursora apresenta reatividade cruzada com fragmento (ou porções) de qualquer uma das tioesterases obtidas a partir de uma *E. coli*, ou a partir de uma *E. coli K-12*, e/ou de qualquer uma das tioesterases que contém a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:31. A enzima precursora apresentando reatividade imunológica cruzada com 'TesA pode ser uma proteína que ocorre na natureza, uma proteína previamente modificada, ou uma proteína sintética.

Em outro exemplo particular, a tioesterase precursora é uma 'TesA proveniente de uma *E. coli*, ou é um homólogo, um parálogo ou um ortólogo de uma 'TesA proveniente de uma *E. coli*, tal como uma 'TesA proveniente de uma *E.coli K12*. O precursor da tioesterase do qual um mutante da presente invenção é derivado pode também ser uma porção enzimaticamente ativa ou um fragmento de qualquer uma das tioesterases previamente descritas.

Em uma concretização da invenção, uma tioesterase mutante (ou uma equivalente desta que ocorre na natureza) é provida que contém uma sequência de aminoácidos apresentando pelo menos uma substituição de um aminoácido, quando comparado a uma tioesterase precursora, de modo que a tioesterase mutante apresenta pelo menos uma propriedade alterada em relação à tioesterase precursora. Em uma concretização exemplar da invenção, uma tioesterase mutante é provida que apresenta uma sequência de aminoácidos com uma mutação de substituição única, e exibe pelo menos uma propriedade alterada quando comparada à tioesterase precursora da qual o mutante é derivado. Em uma concretização exemplar da invenção, uma tioesterase mutante é

provida que contém uma sequência de aminoácido apresentando duas ou mais mutações de substituição a partir da sequência da sua tioesterase precursora, e a tioesterase mutante apresenta pelo menos uma propriedade alterada quando comparada à tioesterase precursora.

Em uma concretização da invenção, uma tioesterase mutante (ou uma equivalente desta que ocorre na natureza) é provida, que é uma variante de uma tioesterase precursora, e que apresenta pelo menos uma propriedade alterada *in vitro* ou *in vivo* em relação a tal tioesterase precursora, caracterizado pelo fato da tioesterase precursora ser uma tioesterase que contém uma sequência análoga a SEQ ID NO:31 e, de acordo, contém resíduos de aminoácidos correspondendo a resíduos de aminoácidos 1-182 de SEQ ID NO:31, e caracterizado pelo fato da tioesterase precursora ser modificada em uma ou mais posições de aminoácidos selecionados a partir de posições correspondendo a um ou mais resíduos 1-182 de SEQ ID NO:31.

Em uma concretização da invenção, uma tioesterase mutante (ou uma equivalente desta que ocorre na natureza) é provida, que é uma variante de uma tioesterase precursora que contém uma sequência análoga a SEQ ID NO:31 e, de acordo, contém resíduos de aminoácidos correspondentes 1-182 de SEQ ID NO:31, e que apresenta pelo menos uma propriedade alterada *in vitro* ou *in vivo* em relação a tal tioesterase precursora, caracterizado pelo fato da tioesterase precursora ser mutada em uma ou mais posições correspondendo a uma ou mais posições de aminoácidos de SEQ ID NO:31 selecionadas dentre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28,

29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, e/ou 182.

Em uma concretização da invenção, uma tioesterase mutante (ou uma equivalente que ocorre na natureza) é provida, que é uma variante de uma tioesterase precursora que contém uma sequência análoga a SEQ ID NO:31 e, de acordo, contém resíduos de aminoácido correspondentes 1-182 de SEQ ID NO:31, e que apresenta pelo menos uma propriedade alterada *in vitro* ou *in vivo* em relação a tal tioesterase precursora, caracterizada pelo fato da tioesterase precursora ser mutada com uma ou mais substituições selecionada dentre A1C, A1F, A1L, A1Q, A1R, A1S, A1V, A1Y, D2E, D2H, D2K, D2L, D2M, D2P, D2R, D2W, T3E, T3G, T3K, T3L, T3R, T3W, L4A, L4G, L4M, L4N, L4S, L4V, L4Y, L5C, L5E, L5F, L5G, L5H, L5K, L5N, L5Q, L5S, L5W, L5Y, I6A, I6L, I6T, I6V, L7A, L7C, L7E, L7K, L7M, L7N, L7S, L7T, L7V, L7W, L7Y, G8A, G8K, G8S, D9N, D9T, S10C, L11A, L11C, L11I, L11M, L11Q, L11V, S12A, S12I, S12L, S12M, S12N, S12T, S12V, S12Y, A13C, A13D, A13G, A13H, A13I, A13L, A13N, A13S, A13T, A13V, A13W, A13Y, G14A, G14C, G14E, G14F, G14I, G14K, G14M, G14N, G14P, G14Q, G14R, G14S, G14T, G14V, Y15A, Y15C, Y15D, Y15E, Y15G, Y15I, Y15L, Y15M, Y15N, Y15Q, Y15R, Y15S, Y15V, R16A, R16D,

R16E, R16G, R16H, R16I, R16L, R16M, R16N, R16P, R16Q, R16S, R16T, R16V, R16W, M17A, M17C, M17D, M17E, M17G, M17K, M17L, M17N, M17P, M17Q, M17R, M17S, M17T, M17V, S18E, S18M, S18N, S18T, A19C, A19E, A19L, A19V, S20A, S20C, S20D, S20G, S20L, S20T, S20W, A21G, A21I, A21L, A21P, A21Y, A22C, A22D, A22E, A22F, A22G, A22H, A22I, A22K, A22L, A22M, A22N, A22P, A22R, A22S, A22T, A22Y, W23A, W23H, W23N, W23P, W23Y, P24A, P24C, P24D, P24E, P24F, P24G, P24I, P24M, P24N, P24S, P24T, P24V, P24W, A25D, A25E, A25L, A25N, A25P, A25Q, A25R, A25S, A25V, L26C, L26D, L26E, L26F, L26G, L26H, L26I, L26K, L26N, L26P, L26Q, L26R, L26S, L26V, L26W, L26Y, L27A, L27C, L27F, L27H, L27M, L27R, L27S, L27T, L27V, L27W, L27Y, N28A, N28G, N28I, N28K, N28M, N28P, N28R, N28W, D29M, D29P, D29V, K30P, W31D, W31E, W31G, W31L, W31N, W31P, W31R, W31S, W31T, Q32V, Q32Y, S33F, S33G, S33I, S33M, S33R, K34A, K34H, K34M, K34R, T35F, T35G, T35K,T35L, T35M, T35Q, T35V, T35Y, S36A, S36F, S36H, S36I, S36L, S36W, V37A, V37F, V37G, V37H, V37L, V37N, V37S, V37Q, V37S, V37W, V37Y, V38D, V38E, V38F, V38G, V38K, V38L, V38P, V38R, V38S, N39A, N39C, N39E, N39F, N39G, N39K, N39M, N39P, N39Q, N39R, N39T, N39V, N39W, N39Y, A40D, A40G, A40H, A40L, A40M, A40P, A40T, A40V, A40Y, S41C, S41P, S41T, I42A, I42C, I42D, I42E, I42G, I42K, I42L, I42M, I42P, I42S, I42T, I42W, I42Y, S43A, S43C, S43D, S43E, S43F, S43G, S43H, S43L, S43M, S43N, S43P, S43R, S43T, S43V, S43W, G44A, G44C, G44E, G44F, G44H, G44K, G44L, G44M, G44N, G44Q, G44R, G44S, G44W, G44Y, D45A, D45C, D45E, D45F, D45G, D45H, D45I, D45K, D45L, D45M, D45P, D45Q, D45S, D45T, D45V, D45W, T46A, T46C, T46D, T46E, T46F, T46G, T46I, T46K, T46L, T46N, T46R, T46S, T46V, T46W, S47A, S47C, S47E, S47F, S47G, S47L, S47M, S47P, S47Q, S47R, S47T, S47V, S47W, S47Y, Q48C, Q48D, Q48E, Q48F, Q48G, Q48I, Q48M, Q48S, Q48T, Q48V, Q48W, Q48Y, Q49A, Q49C, Q49D, Q49E, Q49G, Q49H, Q49I, Q49K, Q49L, Q49M, Q49P,

Q49R, Q49S, Q49V, Q49W, Q49Y, G50A, G50C, G50E, G50F, G50I, G50K, G50L, G50M, G50N, G50P, G50Q, G50R, G50S, G50T, G50W, G50Y, L51A, L51C, L51D, L51F, L51H, L51N, L51P, L51S, L51T, L51V, L51W, L51Y, A52C, A52D, A52H, A52I, A52L, A52M, A52P, A52R, A52V, A52W, A52Y, R53A, R53C, R53D, R53E, R53F, R53G, R53I, R53K, R53L, R53N, R53S, R53T, R53V, R53W, R53Y, L54A, L54C, L54E, L54F, L54G, L54M, L54N, L54S, L54T, L54W, L54Y, P55A, P55G, P55Y, A56P, A56R, A56W, A56Y, L57A, L57C, L57F, L57G, L57H, L57I, L57K, L57N, L57P, L57Q, L57R, L57S, L57T, L57V, L57W, L57Y, L58A, L58D, L58E, L58F, L58G, L58H, L58I, L58M, L58N, L58R, L58S, L58V, L58W, L58Y, K59E, K59R, K59V, Q60E, Q60M, Q60P, H61A, H61D, H61E, H61G, H61P, H61W, Q62G, Q62M, Q62P, Q62W, P63D, P63E, P63G, P63I, P63K, P63L, P63M, P63N, P63Q, P63R, P63S, P63T, P63V, P63W, R64D, R64E, R64F, R64L, R64M, R64P, R64Q, R64W, R64Y, W65A, W65E, W65G, W65K, W65L, W65M, W65N, W65P, W65R, W65V, V66C, V66G, V66I, V66M, V66N, V66Q,V66S, V66W, V66Y, L67A, L67C, L67E, L67G, L67M, L67Q, L67Q, L67S, L67T, L67W, V68A, V68E, V68G, V68L, V68M, V68N, V68P, V68Q, V68S, V68T, E69A, E69C, E69D, E69F, E69G, E69H, E69K, E69L, E69M, E69N, E69P, E69Q, E69S, E69V, E69W, E69Y, L70A, L70C, L70E, L70F, L70G, L70H, L70I, L70K, L70Q, L70S, L70T, L70V, L70W, G71A, G71C, G71S, G72A, G72C, G72M, G72P, G72S, N73A, N73C, N73G, N73H, N73I, N73L, N73P, N73R, N73S, N73T, N73V, N73W, D74A, D74C, D74E, D74F, D74G, D74Q, D74S, D74W, D74Y, G75A, G75C, G75D, G75E, G75F, G75I, G75K, G75L, G75M, G75N, G75P, G75R, G75T, G75V, G75W, G75Y, L76A, L76C, L76D, L76E, L76F, L76G, L76I, L76K, L76M, L76N, L76P, L76Q, L76R, L76T, L76V, L76W, R77A, R77C, R77D, R77E, R77F, R77G, R77H, R77K, R77L, R77N, R77Q, R77S, R77V, R77W, G78A, G78C, G78D, G78E, G78F, G78M, G78N, G78P, G78Q, G78R, G78S, G78T, G78V, G78Y, F79A, F79D, F79E, F79G, F79H, F79K, F79M, F79N, F79P, F79Q, F79S, F79V, F79W, F79Y, Q80A, Q80E,

Q80G, Q80L, Q80M, Q80S, Q80W, Q80Y, P81A, P81E, P81K, P81L, P81M, P81N, P81T, P81W, P81Y, Q82A, Q82F, Q82I, Q82M, Q82N, Q82P, Q82R, Q82S, Q82T, Q82V, Q82W, Q82Y, Q83A, Q83C, Q83F, Q83G, Q83K, Q83L, Q83M, Q83N, Q83R, Q83S, Q83T, Q83V, Q83W, Q83Y, T84A, T84D, T84E, T84F, T84G, T84H, T84K, T84L, T84M, T84N, T84Q, T84R, T84S, T84V, T84W, T84Y, E85A, E85C, E85D, E85F, E85G, E85L, E85P, E85Q, E85R, E85S, E85T, E85V, E85W, E85Y, Q86A, Q86G, Q86H, Q86K, Q86P, Q86T, Q86V, Q86W, Q86Y, T87A, T87C, T87D, T87E, T87F, T87G, T87H, T87L, T87M, T87P, T87R, T87S, T87V, T87W, L88A, L88C, L88E, L88F, L88G, L88H, L88Q, L88S, L88W, L88Y, R89A, R89G, R89H, R89L, R89P, R89T, R89V, R89W, Q90E, Q90L, Q90N, Q90P, Q90W, Q90Y, I91E, I91G, I91L, I91M, I91N, I91Q, I91S, I91V, I91Y, L92A, L92C, L92E, L92G, L92H, L92N, L92Q, L92R, L92S, L92T, L92V, L92Y, Q93A, Q93E, Q93F, Q93G, Q93H, Q93I, Q93L, Q93M, Q93N, Q93P, Q93S, Q93V, Q93W, Q93Y, D94C, D94E, D94F, D94G, D94H, D94K, D94L, D94N, D94P, D94Q, D94R, D94S, D94V, V95A, V95C, V95D, V95E, V95F, V95G, V95I, V95L, V95M, V95N, V95P, V95Q, V95T, V95W, V95Y, K96A, K96C, K96L, K96N, K96P, K96Q, K96R, K96V, K96Y, A97C, A97E, A97F, A97K, A97N, A97P, A97R, A97V, A97W, A98E, A98G, A98K, A98L, A98P, A98V, A98W, A98Y, N99A, N99C, N99D, N99G, N99L, N99M, N99P, N99Q, N99R, N99S, N99W, N99Y, A100D, A100E, A100G, A100H, A100I, A100K, A100L, A100M, A100Q, A100R, A100S, A100T, A100V, A100W, A100Y, E101A, E101D, E101G, E101L, E101M, E101P, E101S, E101T, E101V, P102E, P102F, P102G, P102H, P102I, P102L, P102Q, P102R, P102S, P102V, P102W, P102Y, L103A, L103C, L103E, L103G, L103I, L103K, L103N, L103Q, L103R, L103S, L103T, L103V, L103W, L104A, L104C, L104E, L104G, L104I, L104N, L104P, L104Q, L104S, L104W, L104Y, M105A, M105C, M105E, M105F, M105G, M105I, M105K, M105L, M105P, M105T, M105V, M105W, Q106A, Q106C, Q106D, Q106G, Q106H, Q106K, Q106L, Q106M, Q106R,

Q106S, Q106T, Q106V, Q106W, Q106Y, I107A, I107C, I107E, I107F, I107G, I107K, I107L, I107M, I107Q, I107S, I107T, I107V, I107Y, R108A, R108C, R108D, R108E, R108F, R108G, R108H, R108I, R108L, R108M, R108S, R108V, R108W, R108Y, L109A, L109C, L109D, L109E, L109F, L109G, L109K, L109M, L109P, L109Q, L109R, L109S, L109T, L109V, L109Y, P110A, P110C, P110D, P110E, P110F, P110G, P110H, P110K, P110L, P110M, P110N, P110R, P110S, P110V, P110W, A111C, A111E, A111L, A111M, A111N, A111P, A111Q, A111R, A111S, A111V, A111W, A111Y, N112A, N112F, N112G, N112I, N112K, N112L, N112P, N112R, N112V, N112W, N112Y, Y113A, Y113C, Y113D, Y113E, Y113G, Y113I, Y113M, Y113P, Y113Q, Y113S, Y113S, Y113W, G114A, G114F, G114K, G114L, G114M, G114P, G114W, G114Y, R115A, R115C, R115E, R115G, R115I, R115N, R115P, R115Q, R115S, R115V, R115W, R115Y, R116C, R116D, R116E, R116H, R116T, R116V, R116W, Y117A, Y117C, Y117D, Y117E, Y117G, Y117H, Y117I, Y117L, Y117M, Y117N, Y117P, Y117Q, Y117R, Y117S, Y117T, Y117V, Y117W, N118A, N118C, N118E, N118F, N118G, N118H, N118I, N118K, N118L, N118M, N118P, N118Q, N118S, N118T, N118V, N118W, E119C, E119D, E119F, E119G, E119K, E119L, E119M, E119P, E119Q, E119R, E119T, E119W, E119Y, A120D, A120E, A120G, A120I, A120L, A120P, A120T, A120W, F121A, F121C, F121D, F121E, F121G, F121K, F121L, F121M, F121N, F121P, F121Q, F121R, F121S, F121V, F121W, F121Y, S122A, S122C, S122D, S122E, S122F, S122G, S122I, S122L, S122M, S122P, S122R, S122V, S122W, S122Y, A123C, A123E, A123F, A123H, A123L, A123R, A123T, A123V, A123W, A123Y, I124A, I124C, I124D, I124E, I124G, I124H, I124K, I124L, I124R, I124S, I124T, I124W, I124Y, Y125C, Y125F, Y125G, Y125H, Y125I, Y125L, Y125P, Y125Q, Y125R, Y125S, Y125T, Y125V, Y125W, P126C, P126F, P126H, P126K, P126R, P126T, P126V, P126Y, K127A, K127I, K127P, K127S, L128A, L128C, L128E, L128F, L128G,

L128Q, L128R, L128S, L128T, L128V, L128W, A129D, A129F, A129H, A129I, A129K, A129L, A129N, A129W, A129Y, K130E, K130I, K130P, K130V, E131A, E131C, E131D, E131F, E131G, E131I, E131K, E131L, E131N, E131P, E131V, E131W, F132C, F132D, F132E, F132K, F132L, F132N, F132P, F132T, F132V, D133C, D133K, D133R, D133S, D133T, D133V, D133Y, V134C, V134D, V134E, V134I, V134K, V134M, V134N, V134P, V134Q, V134R, V134S, V134W, V134Y, P135A, P135E, P135K, P135Q, L136A, L136C, L136D, L136E, L136F, L136G, L136H, L136K, L136M, L136N, L136P, L136Q, L136R, L136S, L136T, L137A, L137C, L137D, L137E, L137G, L137H, L137K, L137P, L137Q, L137R, L137S, L137Y, P138E, P138F, P138G, P138N, P138R, P138T, P138V, F139A, F139C, F139D, F139E, F139G, F139H, F139L, F139M, F139N, F139S, F139T, F139V, F139W, F140A, F140C, F140G, F140I, F140L, F140M, F140N, F140P, F140S, F140T, F140V, F140W, M141A, M141C, M141D, M141E, M141F, M141G, M141K, M141L, M141P, M141Q, M141R, M141T, M141V, M141W, M141Y, E142A, E142C, E142G, E142I, E142L, E142M, E142N, E142P, E142Q, E142R, E142S, E142T, E142V, E142W, E142Y, E143A, E143D, E143F, E143G, E143I, E143M, E143P, E143W, V144A, V144D, V144E, V144G, V144H, V144N, V144P, V144Q, V144R, V144S, V144W, V144Y, Y145A, Y145C, Y145D, Y145E, Y145G, Y145I, Y145L, Y145M, Y145N, Y145Q, Y145R, Y145S, Y145T, Y145W, L146A, L146C, L146D, L146E, L146G, L146H, L146P, L146S, L146W, K147G, K147P, K147R, K147W, P148D, P148E, P148W, Q149L, W150C, W150D, W150E, W150G, W150L, W150P, W150Q, W150R, W150T, M150V, M151A, M151C, M151D, M151E, M151F, M151G, M151I, M151L, M151Q, M151R, M151S, M151T, M151V, M151W, Q152A, Q152D, Q152E, Q152F, Q152H, Q152I, Q152K, Q152L, Q152N, Q152P, Q152R, Q152S, Q152T, Q152V, Q152Y, D153A, D153E, D153F, D153I, D153K, D153M, D153P, D153Q, D153V, D153W, D154A, D154C, D154E, D154F, D154G, D154H, D154I, D154K,

D154L, D154M, D154N, D154P, D154R, D154S, D154T, D154V, D154W, G155A, G155F, G155H, G155I, G155P, G155V, G155W, G155Y, I156A, I156C, I156E, I156F, I156G, I156K, I156L, I156M, I156Q, I156R, I156S, I156T, I156V, I156Y, H157C, H157E, P158A, P158F, P158G, P158H, P158I, P158L, P158Q, P158S, P158T, P158V, P158W, N159C, N159E, N159G, N159I, N159K, N159L, N159M, N159P, N159Q, N159R, N159T, N159V, N159W, R160A, R160C, R160D, R160E, R160G, R160H, R160I, R160K, R160N, R160Q, R160S, R160W, D161E, D161G, D161I, D161K, D161L, D161M, D161N, D161Q, D161R, D161S, D161V, D161W, A162G, A162I, A162K, A162L, A162N, A162R, A162T, A162V, A162Y, Q163A, Q163C, Q163D, Q163E, Q163F, Q163G, Q163I, Q163L, Q163M, Q163S, Q163T, Q163V, Q163W, Q163Y, P164A, P164C, P164D, P164K, P164L, P164M, P164N, P164R, P164T, P164V, P164W, F165D, F165E, F165G, F165H, F165I, F165K, F165L, F165M, F165R, F165S, F165T, F165V, F165W, F165Y, I166A, I166C, I166F, I166L, I166M, I166S, I166V, I166Y, A167C, A167D, A167E, A167F, A167G, A167K, A167L, A167M, A167N, A167Q, A167R, A167T, A167V, A167W, A167Y, D168A, D168G, D168H, D168L, D168M, D168P, D168R, D168T, D168V, D168W, W169A, W169D, W169E, W169G, W169K, W169M, W169Q, W169R, W169S, W169T, W169V, M170A, M170E, M170F, M170G, M170H, M170L, M170N, M170Q, M170S, M170T, M170V, M170W, M170Y, A171E, A171F, A171I, A171S, A171V, A171W, K172A, K172M, K172P, Q173D, Q173I, Q173N, Q173P, Q173W, Q173Y, L174A, L174F, L174G, L174Q, L174S, L174T, L174W, L174W, L174Y, Q175F, Q175I, Q175L, Q175M, Q175Y, P176D, P176H, P176K, P176L, P176N, P176Q, P176R, P176V, P176W, P176Y, L177D, L177F, L177G, L177M, L177S, L177T, V178A, V178F, V178G, V178K, V178L, V178R, V178S, V178T, V178W, N179G, N179H, N179R, N179T, N179V, N179W, N179Y, H180A, H180E, H180G, H180L, H180P, H180R, H180S, H180V, H180W, D181A, D181C, D181E, D181G, D181H,

D181I, D181L, D181P, D181Q, D181R, D181S, D181T, D181W, S182A, S182C, S182D, S182E, S182G, S182I, S182K, S182L, S182N, S182P, S182Q, S182R, S182T, e/ou S180V, caracterizado pelo fato dos números nas designações de mutação de substituição se referirem a posições de aminoácidos de SEQ ID NO:31.

Em uma concretização da invenção, uma tioesterase mutante (ou uma equivalente desta que ocorre na natureza) é provida, que apresenta uma especificidade de substrato aumentada para, e/ou atividade aumentada (*ex.*, taxa catalítica) com respeito a substratos C_{10} (*i.e.*, substratos, as cadeias de carbono das quais são de 10 carbonos de comprimento), e que é uma variante de uma tioesterase precursora que contém uma sequência análoga a SEQ ID NO:31, caracterizada pelo fato da tioesterase precursora ser mutada em uma ou mais posições de aminoácidos correspondendo a um ou mais resíduos selecionados dentre 5-30, 35-60, 65-98, 102-139, e/ou 140-180 de SEQ ID NO:31. A especificidade de substrato aumentada para, e/ou atividade com respeito a substratos C_{10} podem ser medidas *in vitro* e/ou *in vivo*.

Em uma concretização da invenção, uma tioesterase mutante (ou uma equivalente desta que ocorre naturalmente) é provida, que apresenta uma especificidade de substrato aumentada para, e/ou atividade aumentada (*ex.*, taxa catalítica) com respeito a substratos C_{10}, e que é uma variante de uma tioesterase precursora que contém uma sequência análoga a SEQ ID NO:31, caracterizada pelo fato da tioesterase precursora ser mutada em um ou mais posições de aminoácidos correspondendo a um ou mais resíduos de SEQ ID NO:31 selecionados dentre 1, 3, 4, 7, 9, 12, 13, 14, 16, 17, 20, 22, 24, 25, 28, 32, 38, 39, 40, 42, 43, 46, 47, 48, 49,

50, 51, 52, 54, 56, 59, 60, 64, 68, 72, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 130, 132, 133, 134, 138, 139, 140, 141, 142, 144, 145, 146, 147, 148, 150, 151, 152, 156, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, e/ou 182. A especificidade de substrato aumentada para, e/ou atividade com respeito a substratos C_{10} podem ser medidas *in vitro* e/ou *in vivo*.

Em uma concretização da invenção, uma tioesterase mutante (ou uma equivalente que ocorre na natureza) é provida, que apresenta uma especificidade de substrato aumentada para, e/ou atividade (*ex.*, taxa catalítica) com respeito a substratos C_{10}, e que é uma variante de uma tioesterase precursora que contém uma sequência análoga a SEQ ID NO:31, caracterizada pelo fato da tioesterase precursora ser mutada com uma ou mais substituições selecionadas dentre A1L, A1S, T3K, L4A, L7M, L7V, D9N, S12A, A13D, G14A, G14E, G14P, G14Q, G14R, G14S, G14V, R16G, R16L, R16M, R16N, R16P, R16Q, R16T, M17C, M17L, M17T, M17V, S20A, S20C, S20D, S20G, S20L, S20T, S20W, A22C, A22D, A22E, A22G, A22H, A22I, A22K, A22N, P24A, P24C, P24D, P24F, P24I, P24S, P24T, P24V, P24W, A25E, A25L, A25N, A25Q, A25V, N28A, N28R, Q32V, Q32Y, V38E, V38K, V38R, N39A, N39T, A40D, A40H, I42A, I42E, I42L, I42S, I42T, I42W, I42Y, S43A, S43C, S43D, S43E, S43L, S43N, S43P, T46E, T46F, T46I, T46L, T46V, S47A, S47C, S47F, S47G, S47L, S47M, S47T, S47V, Q48D, Q48E, Q48G, Q48S, Q48T, Q48V, Q48W, Q49A, Q49C, Q49D, Q49G, Q49H, Q49L, Q49M, Q49S, G50A, G50Q, L51A, L51F, L51H, L51Y, A52D, A52M, L54T, A56P, K59R, Q60M, R64D, R64E, R64Q, V68L, G72A, G72C, G72P, G72S,

G75A, G75C, G75D, G75E, G75F, G75I, G75K, G75L, G75M, G75N, G75P, G75T, G75V, G75W, G75Y, L76A, L76D, L76G, L76I, L76K, L76M, L76N, L76P, L76Q, L76R, L76W, R77G, R77L, R77Q, G78A, G78C, G78E, G78F, G78M, G78N, G78Q, G78R, G78S, G78T, G78V, G78Y, F79A, F79D, F79E, F79G, F79H, F79N, F79Q, F79W, F79Y, Q80E, P81N, P81T, P81Y, Q82R, Q82S, Q82T, Q83A, Q83C, Q83F, Q83G, Q83K, Q83L, Q83M, Q83N, Q83R, Q83S, Q83T, Q83V, Q83W, Q83Y, T84A, T84F, T84L, T84M, T84N, T84Q, T84V, T84Y, E85A, E85C, E85L, E85Q, E85R, E85S, E85T, E85W, E85Y, Q86A, Q86G, Q86K, Q86T, T87D, T87P, R89A, R89G, Q90E, Q90Y, I91V, L92V, Q93A, Q93E, Q93G, Q93H, Q93I, Q93L, Q93S, Q93W, Q93Y, D94E, D94F, D94G, D94H, D94K, D94N, D94Q, D94R, D94S, D94V, V95L, V95T, K96V, K96Y, A98W, N99G, N99L, N99P, N99Q, N99R, N99Y, A100G, A100V, E101A, E101D, E101G, E101L, E101M, E101S, E101T, E101V, P102S, L103G, M105C, M105I, M105V, Q106A, Q106D, Q106H, Q106W, I107Y, R108A, R108D, R108E, R108F, R108G, R108H, R108I, R108L, R108M, R108S, R108W, R108Y, L109A, L109D, L109E, L109F, L109G, L109K, L109P, L109R, L109S, L109Y, P110C, P110D, P110E, P110F, P110G, P110H, P110K, P110L, P110M, P110N, P110R, P110S, P110V, P110W, A111C, A111E, A111L, A111M, A111P, A111Q, A111R, A111V, A111W, A111Y, N112A, N112F, N112G, N112K, N112R, N112W, Y113A, Y113C, Y113G, Y113I, Y113M, G114K, G114L, G114P, R115A, R115C, R115E, R115G, R115N, R115S, R115W, R115Y, R116D, R116E, R116W, Y117A, Y117C, Y117E, Y117I, Y117L, Y117N, Y117Q, Y117R, Y117S, Y117T, Y117V, N118C, N118G, N118I, N118K, N118S, N118T, N118V, N118W, E119C, E119F, E119G, E119K, E119M, E119R, E119W, E119Y, A120D, A120E, A120G, A120W, F121A, F121D, F121E, F121M, F121P, F121Q, F121R, F121S, F121Y, S122D, S122E, S122F, S122I, S122L, S122M, S122V, S122W, S122Y, A123H, A123L, A123V, I124T, Y125C, Y125F, Y125G, Y125P, Y125S, Y125V, Y125W, P126R, P126T, P126V,

P126Y, K127S, L128C, L128T, L128V, K130E, K130I, K130V, F132D, F132E, F132N, F132T, D133K, D133R, D133S, D133T, D133V, D133Y, V134I, V134M, V134S, P138E, P138N, P138R, P138T, P138V, F139A, F139D, F139G, F139H, F139M, F139S, F139W, F140C, F140G, F140M, F140N, F140P, F140S, M141A, M141C, M141D, M141E, M141F, M141G, M141K, M141L, M141P, M141Q, M141R, M141T, M141V, M141W, M141Y, E142A, E142C, E142P, E142Q, E142W, E142Y, V144D, V144E, V144G, V144H, V144N, V144P, V144Q, V144R, V144S, V144W, V144Y, Y145A, Y145C, Y145D, Y145E, Y145G, Y145I, Y145L, Y145M, Y145N, Y145Q, Y145T, Y145W, L146A, L146C, L146D, L146E, L146G, L146H, L146S, L146W, K147G, K147P, K147W, P148D, P148E, W150C, W150D, W150E, W150G, W150L, W150Q, W150T, M151A, M151C, M151E, M151F, M151G, M151I, M151Q, M151S, M151T, M151V, M151W, Q152D, Q152F, Q152I, Q152L, Q152T, I156L, P158A, P158F, P158G, P158H, P158I, P158L, P158Q, P158T, P158V, N159C, N159E, N159G, N159I, N159K, N159L, N159M, N159R, N159T, N159V, R160A, R160C, R160D, R160E, R160G, R160H, R160N, R160Q, R160S, R160W, D161E, D161G, D161I, D161K, D161L, D161M, D161Q, D161R, D161W, A162I, A162L, A162T, A162V, A162Y, Q163G, Q163L, Q163M, Q163S, P164A, P164C, P164D, P164M, P164N, P164R, P164V, P164W, F165D, F165E, F165G, F165H, F165I, F165K, F165L, F165M, F165R, F165S, F165T, F165V, F165Y, I166F, I166L, I166M, I166V, A167C, A167M, A167R, A167T, D168G, D168P, D168R, W169E, W169K, W169Q, M170F, M170H, M170L, M170T, M170V, M170Y, A171E, A171F, A171V, A171W, K172A, K172M, Q173N, Q175I, P176H, P176K, P176N, P176W, L177M, L177T, V178T, V178W, N179G, N179H, N179R, N179T, N179V, N179Y, H180E, H180G, H180R, H180V, H180W, D181A, D181H, D181I, D181L, D181P, D181R, D181W, S182A, S182G, S182K, S182L, S182P, e/ou S182R, caracterizado pelo fato dos números nas designações de mutação de substituição se

referirem a posições de aminoácidos de SEQ ID NO:31. A especificidade de substrato aumentada para, e/ou atividade com respeito a substratos C_{10} podem ser medidas *in vitro* e/ou *in vivo*.

Em uma concretização da invenção, uma tioesterase mutante (ou uma equivalente desta que ocorre na natureza) é provida, que apresenta uma especificidade de substrato aumentada para, e/ou atividade aumentada (*ex.*, taxa catalítica) no que diz respeito a substrato C_{12} (*i.e.*, substratos, as cadeias de carbono das quais têm 12 carbonos de comprimento), e que é uma variante de uma tioesterase precursora que contém uma sequência análoga a SEQ ID NO:31, caracterizada pelo fato da tioesterase precursora ser mutada em uma ou mais posições de aminoácidos correspondendo aos resíduos 10-25, 35-85, 90-103, 110-143, 146-180 de SEQ ID NO:31. A especificidade de substrato aumentada para, e/ou atividade aumentada no que diz respeito a substratos C_{12} podem ser medidas *in vitro* e/ou *in vivo*.

Em uma concretização da invenção, uma tioesterase mutante (ou uma equivalente desta que ocorre na natureza) é provida, que apresenta uma especificidade de substrato aumentada para, e/ou atividade aumentada (*ex.*, taxa catalítica) no que diz respeito a substratos C_{12}, e que é uma variante de uma tioesterase precursora que contém uma sequência análoga a SEQ ID NO:31, caracterizado pelo fato da tioesterase precursora ser mutada em uma ou mais posições de aminoácidos correspondendo a um ou mais resíduos de SEQ ID NO:31 selecionados dentre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 35, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45,

46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 57, 58, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 119, 120, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 133, 134, 136, 137, 140, 141, 142, 145, 149, 152, 153, 155, 156, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 166, 167, 168, 169, 170, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 179, 180, 181, e/ou 182. A especificidade de substrato aumentada para, e/ou atividade aumentada no que diz respeito a substratos C_{12} podem ser medidas *in vitro* e/ou *in vivo*.

Em uma concretização da invenção, uma tioesterase mutante (ou uma equivalente desta que ocorre na natureza) é provida, que apresenta uma especificidade de substrato aumentada para, e/ou atividade aumentada (*ex.*, taxa catalítica) no que diz respeito a substratos C_{12}, e que é uma variante de uma tioesterase precursora que contém uma sequência análoga a SEQ ID NO:31, caracterizado pelo fato da tioesterase precursora ser mutada com uma ou mais substituições selecionadas dentre A1Q, A1S, A1V, D2E, D2K, D2P, D2W, T3R, T3W, L4A, L4Y, L5F, L5G, L5S, L5Y, I6T, I6V, L7A, L7C, L7M, L7N, L7S, L7T, L7V, L7Y, D9N, L11M, S12A, S12I, S12V, A13C, A13G, A13H, A13I, A13L, A13N, A13T, A13W, G14F, G14I, G14K, G14M, G14V, Y15A, Y15C, Y15D, Y15E, Y15G, Y15I, Y15L, Y15M, Y15N, Y15Q, Y15R, Y15S, Y15V, R16D, R16E, R16G, R16H, R16I, R16L, R16N, R16P, R16S, R16T, R16V, R16W, M17A, M17C, M17G, M17K, M17N, M17P, M17Q, M17R, M17S, M17T, S18M, S18N, A19L, S20A, S20C, S20D, S20G, S20L, S20T, S20W, A21I, A21L, A21P, A21Y, A22F, A22L, A22M, A22N, A22R, A22Y, P24G, P24V, A25D, A25E, A25L, A25N, A25Q, A25R, A25V, L26D, L26E, L26F, L26G, L26H, L26I, L26K, L26N, L26R,

L26S, L26W, L26Y, L27A, L27C, L27F, L27M, L27W, L27Y, N28R, N28W, D29P, K30P, W31E, W31N, T35L, T35Y, V37F, V37S, V37W, V38D, V38F, V38G, V38P, N39A, N39C, N39E, N39G, N39Q, N39W, A40D, A40L, A40M, A40P, A40V, A40Y, S41C, S41T, I42A, I42C, I42D, I42E, I42G, I42K, I42L, I42M, I42P, I42S, I42T, I42W, I42Y, S43A, S43D, S43E, S43F, S43G, S43H, S43L, S43M, S43N, S43R, S43T, S43V, G44C, G44E, G44H, G44K, G44L, G44N, G44Q, G44R, G44S, D45A, D45C, D45E, D45F, D45H, D45I, D45K, D45L, D45M, D45P, D45Q, D45S, D45T, D45V, D45W, T46A, T46C, T46D, T46G, T46K, T46N, T46R, T46S, S47P, S47Q, Q48E, Q48V, Q48W, Q48Y, Q49A, Q49C, Q49D, Q49E, Q49G, Q49H, Q49I, Q49K, Q49L, Q49M, Q49P, Q49R, Q49S, Q49V, Q49W, Q49Y, G50A, G50C, G50F, G50I, G50K, G50L, G50M, G50N, G50P, G50Q, G50R, G50S, G50T, G50Y, L51A, L51D, L51N, L51T, L51V, L51W, A52C, A52M, A52P, A52W, R53A, R53C, R53D, R53E, R53F, R53G, R53I, R53K, R53L, R53N, R53S, R53T, R53V, R53W, R53Y, L54A, L54C, L54E, L54F, L54G, L54M, L54N, L54S, L54W, L54Y, P55Y, L57A, L57C, L57F, L57K, L57P, L57Q, L57R, L57Y, L58A, L58D, L58E, L58G, L58H, L58N, L58R, L58S, L58W, L58Y, Q60P, H61D, H61G, H61P, Q62P, Q62W, P63I, P63L, P63N, P63S, P63T, P63V, P63W, R64F, R64P, R64W, R64Y, W65A, W65E, W65G, W65K, W65M, W65N, W65V, V66M, V66S, L67A, L67T, V68A, V68L, V68M, V68S, V68T, E69A, E69C, E69D, E69G, E69H, E69K, E69L, E69M, E69N, E69P, E69V, E69Y, L70A, L70C, L70E, L70F, L70H, L70I, L70K, L70Q, L70S, L70T, L70V, G71A, G72A, N73G, N73H, N73L, N73R, N73S, N73T, D74E, D74G, L76I, L76M, L76W, R77C, R77D, R77E, R77G, R77K, R77L, R77Q, R77S, R77V, R77W, G78D, F79P, Q80G, Q80M, Q80S, Q80Y, P81A, P81E, P81K, P81L, P81M, P81W, P81Y, Q82F, Q82V, Q82W, Q82Y, Q83A, T84E, T84R, T84W, Q86A, Q86T, T87E, T87G, T87L, L88C, R89L, R89P, Q90N, Q90P, Q90W, I91G, I91M, I91S, I91V, I91Y, L92A, L92C, L92G, L92H, L92N, L92S, L92T, L92V, L92Y, Q93A, Q93G, Q93H, Q93I, Q93P, Q93Y, D94P, V95F, V95G,

V95L, V95N, V95Q, V95T, V95W, K96A, K96L, K96P, K96Y, A97K, A97P, A98L, A98P, A98V, A98W, A98Y, N99C, N99D, N99G, N99L, N99M, N99P, N99Q, N99R, N99W, N99Y, A100D, A100E, A100G, A100H, A100I, A100K, A100L, A100Q, A100R, A100V, A100W, A100Y, E101G, E101L, E101M, E101P, E101S, E101T, E101V, P102E, P102F, P102H, P102L, P102Q, P102R, P102S, P102W, P102Y, L103E, L103K, L103N, L103Q, L103R, L104C, L104P, L104S, L104W, M105C, M105E, M105G, M105V, Q106A, Q106C, Q106G, Q106K, Q106R, Q106S, Q106T, I107C, I107E, I107K, I107L, I107M, I107S, I107V, R108F, R108W, L109M, A111C, A111Q, A111W, N112A, N112G, N112W, Y113A, Y113D, Y113G, Y113I, G114K, G114L, G114M, G114Y, R115A, R115C, R115E, R115G, R115N, R115S, R115Y, R116H, R116W, Y117C, Y117H, Y117I, Y117L, Y117M, Y117N, Y117S, Y117T, Y117V, E119C, E119F, E119K, E119M, E119R, E119W, E119Y, A120D, A120G, A120I, A120T, A120W, S122F, S122I, S122L, S122M, S122V, S122W, S122Y, A123C, A123F, A123H, A123L, A123R, A123T, A123V, A123W, A123Y, I124G, I124H, I124K, I124L, I124R, I124S, I124Y, Y125F, Y125R, P126C, P126F, P126H, P126Y, K127I, K127P, L128A, L128S, L128T, A129H, A129I, A129K, A129N, A129W, A129Y, K130P, E131A, E131C, E131F, E131G, E131K, E131L, E131N, E131V, E131W, D133K, V134D, V134E, V134K, V134N, V134Q, V134R, V134W, V134Y, L136A, L136D, L136E, L136F, L136G, L136H, L136K, L136N, L136P, L136Q, L136R, L136S, L136T, L137E, L137G, L137H, L137P, L137Q, L137S, L137Y, F140M, M141A, M141C, M141L, M141P, E142C, Y145E, Q149L, Q152A, Q152D, Q152E, Q152H, Q152K, Q152R, Q152Y, D153K, G155F, G155W, G155Y, I156C, I156F, I156M, I156V, P158A, P158G, N159G, N159Q, N159T, N159V, R160A, R160D, R160E, R160G, R160H, R160N, R160Q, R160S, R160W, D161I, D161K, D161L, D161M, D161N, D161Q, D161W, A162G, Q163A, Q163C, Q163G, Q163L, Q163M, Q163S, Q163T, P164C, P164M, I166L, I166V, A167C, A167E,

A167F, A167G, A167K, A167L, A167N, A167Q, A167R, A167T, A167V, A167Y, D168G, D168H, D168L, D168R, D168V, D168W, W169A, W169D, W169E, W169G, W169K, W169Q, W169S, M170F, M170G, M170N, M170Q, M170S, M170V, M170W, K172M, K172P, Q173N, L174A, L174F, L174G, L174T, L174W, Q175I, P176H, P176K, P176L, P176N, P176W, L177D, L177G, N179H, N179R, N179Y, H180A, H180G, D181H, D181I, D181L, D181R, D181W, S182K, S182L, S182P, e/ou S182R, caracterizado pelo fato dos números nas designações de mutação de substituição se referirem a posições de aminoácidos de SEQ ID NO:31. A especificidade de substrato aumentada para, e/ou atividade aumentada no que diz respeito a substratos C_{12} podem ser medidas *in vitro* e/ou *in vivo*.

Em uma concretização da invenção, uma tioesterase mutante (ou uma equivalente desta que ocorre na natureza) é provida, que apresenta uma especificidade de substrato aumentada para, e/ou atividade aumentada (*ex.*, taxa catalítica) no que diz respeito a substrato C_{14} (*i.e.*, substratos, as cadeias de carbono das quais têm 14 carbonos de comprimento), e que é uma variante de uma tioesterase precursora que contém uma sequência análoga a SEQ ID NO:31, caracterizada pelo fato da tioesterase precursora ser mutada em uma ou mais posições de aminoácidos correspondendo aos resíduos 5-20, 35-58, 65-80, 83-90, 110-130, 140-145, 155-160, 165-180 de SEQ ID NO:31. A especificidade de substrato aumentada para, e/ou atividade aumentada no que diz respeito a substratos C_{14} podem ser medidas *in vitro* e/ou *in vivo*.

Em uma concretização da invenção, uma tioesterase mutante (ou uma equivalente desta que ocorre na natureza) é provida, que apresenta uma especificidade de substrato aumentada para, e/ou

atividade aumentada (*ex.*, taxa catalítica) no que diz respeito a substratos C_{14}, e que é uma variante de uma tioesterase precursora que contém uma sequência análoga a SEQ ID NO:31, caracterizado pelo fato da tioesterase precursora ser mutada em uma ou mais posições de aminoácidos correspondendo a um ou mais resíduos de SEQ ID NO:31 selecionados dentre 1, 4, 5, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 20, 21, 22, 23, 25, 26, 28, 29, 33, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 56, 57, 58, 66, 68, 69, 70, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 89, 91, 92, 93, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 131, 133, 134, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 147, 148, 151, 152, 153, 155, 156, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 173, 174, 175, 176, 178, 179, 180, 181, e/ou 182. A especificidade de substrato aumentada para, e/ou atividade aumentada no que diz respeito a substratos C_{14} podem ser medidas *in vitro* e/ou *in vivo*.

Em uma concretização da invenção, uma tioesterase mutante (ou uma equivalente desta que ocorre na natureza) é provida, que apresenta uma especificidade de substrato aumentada para, e/ou atividade aumentada (*ex.*, taxa catalítica) no que diz respeito a substratos C_{14}, e que é uma variante de uma tioesterase precursora que contém uma sequência análoga a SEQ ID NO:31, caracterizado pelo fato da tioesterase precursora ser mutada com uma ou mais substituições selecionadas dentre A1S, L4S, L4Y, L5H, L5Y, L7C, L7M, L7N, L7S, L7T, L7Y, G8S, D9N, D9T, L11C, L11I, L11M, L11Q, L11V, S12I, S12L, S12M, S12T, S12V, A13H, A13I, A13L, A13T, A13V, G14F, G14I, G14R, G14T, G14V, Y15A, Y15C, Y15D,

Y15E, Y15G, Y15I, Y15L, Y15M, Y15N, Y15Q, Y15R, Y15S, Y15V, R16G, R16N, R16P, R16W, M17C, M17D, M17G, M17K, M17N, M17P, M17R, M17S, M17T, S20A, S20D, S20G, S20L, S20T, S20W, A21G, A22L, A22N, A22Y, W23Y, A25E, A25N, A25Q, A25V, L26C, L26F, L26H, L26Q, L26V, L26Y, N28K, N28P, D29V, S33F, S36H, V37H, V37Q, V38F, N39F, N39M, N39Q, N39V, N39W, N39Y, A40G, A40P, A40T, A40V, S41P, S41T, I42A, I42D, I42E, I42G, I42L, I42M, I42P, I42S, I42T, I42W, I42Y, S43A, S43D, S43E, S43F, S43G, S43H, S43L, S43M, S43N, S43T, S43V, S43W, G44A, G44C, G44E, G44F, G44H, G44K, G44L, G44M, G44N, G44Q, G44R, G44S, G44W, G44Y, D45A, D45C, D45E, D45F, D45G, D45H, D45M, D45P, D45Q, D45S, D45T, D45V, D45W, T46A, T46C, T46D, T46G, T46K, T46N, T46S, T46W, S47E, S47P, S47Q, S47W, S47Y, Q48C, Q48F, Q48I, Q48M, Q48V, Q48W, Q48Y, Q49A, Q49C, Q49D, Q49E, Q49G, Q49H, Q49I, Q49K, Q49L, Q49M, Q49P, Q49R, Q49S, Q49V, Q49W, Q49Y, G50A, G50C, G50E, G50F, G50I, G50K, G50L, G50M, G50N, G50P, G50Q, G50R, G50S, G50T, G50W, G50Y, L51A, L51C, L51D, L51S, L51V, A52H, A52I, A52L, A52M, A52P, A52R, A52V, A52W, A52Y, R53A, R53C, R53D, R53E, R53F, R53G, R53I, R53K, R53L, R53N, R53S, R53T, R53V, R53W, R53Y, L54W, L54Y, A56R, A56W, A56Y, L57F, L58F, L58I, L58Y, V66I, V68L, E69A, E69C, E69D, E69F, E69G, E69H, E69K, E69L, E69M, E69N, E69Q, E69S, E69V, E69Y, L70A, L70C, L70E, L70F, L70H, L70Q, L70S, L70T, L70V, L70W, G72A, G72C, G72P, G72S, N73A, N73C, N73G, N73H, N73I, N73L, N73P, N73R, N73S, N73T, N73V, N73W, D74E, D74G, G75A, G75C, G75D, G75E, G75F, G75I, G75K, G75L, G75M, G75N, G75P, G75T, G75W, G75Y, L76A, L76C, L76D, L76E, L76F, L76G, L76I, L76K, L76M, L76N, L76P, L76Q, L76R, L76T, L76V, L76W, R77A, R77C, R77D, R77E, R77F, R77G, R77H, R77K, R77L, R77N, R77Q, R77S, R77V, R77W, G78P, F79M, F79P, F79V, Q80A, Q80G, Q80L, Q80M, Q80S, Q80W, Q80Y, P81A, P81E, P81K, P81L, P81M, P81W, P81Y, Q82F, Q82I, Q82N, Q82P, Q82V, Q82W, Q82Y, Q83A, T84S,

E85D, Q86A, Q86T, Q86V, Q86W, T87A, T87C, T87E, T87F, T87G, T87H, T87L, T87M, T87S, T87V, T87W, R89H, R89T, R89V, R89W, I91L, I91V, I91Y, L92V, Q93A, Q93G, Q93H, Q93I, Q93P, Q93Y, V95L, V95M, V95T, V95W, K96A, K96L, K96P, K96Y, A97W, A98K, A98L, A98W, N99G, N99L, N99P, N99Q, N99R, N99Y, A100G, A100H, A100I, A100K, A100L, A100M, A100R, A100T, A100V, A100Y, E101G, E101L, E101M, E101S, E101T, E101V, P102S, M105A, M105C, M105E, M105G, M105I, M105L, M105V, Q106A, Q106C, Q106D, Q106G, Q106H, Q106K, Q106L, Q106M, Q106R, Q106S, Q106T, Q106V, Q106W, Q106Y, I107C, I107E, I107G, I107L, I107M, I107Q, I107V, R108A, R108C, R108D, R108F, R108I, R108L, R108S, R108V, R108W, R108Y, L109C, L109M, L109Q, L109T, L109V, L109Y, P110A, P110E, P110H, P110N, P110R, P110V, A111C, A111L, A111Q, A111R, A111V, A111W, N112A, N112F, N112G, N112I, N112L, N112P, N112V, N112W, N112Y, Y113A, Y113D, Y113G, Y113I, Y113M, Y113W, G114F, G114K, G114L, G114M, G114W, G114Y, R115A, R115C, R115E, R115G, R115I, R115N, R115P, R115Q, R115S, R115V, R115W, R115Y, R116C, R116H, R116T, R116V, R116W, Y117C, Y117H, Y117I, Y117L, Y117M, Y117N, Y117S, Y117W, N118A, N118C, N118E, N118G, N118H, N118I, N118L, N118M, N118P, N118Q, N118T, N118V, N118W, E119C, E119D, E119F, E119K, E119M, E119P, E119R, E119T, E119W, E119Y, A120D, A120G, A120I, A120L, A120T, A120W, F121A, F121C, F121D, F121E, F121K, F121L, F121M, F121P, F121Q, F121R, F121S, F121V, F121Y, S122A, S122C, S122D, S122E, S122F, S122G, S122I, S122L, S122M, S122P, S122V, S122W, S122Y, A123C, A123E, A123F, A123H, A123L, A123T, A123V, A123W, A123Y, I124A, I124C, I124G, I124L, I124Y, Y125C, Y125F, Y125G, Y125I, Y125L, Y125P, Y125Q, Y125R, Y125S, Y125T, Y125V, P126C, P126H, P126Y, E131I, E131L, D133K, D133Y, V134S, L136C, L136M, L136Q, L136S, L137P, P138E, P138R, P138T, F139M, F140M, M141A, M141C, M141L, M141P, E142A,

E142C, E142L, E142M, E142N, E142P, E142Q, E142S, E142Y, E143I, E143P, K147R, P148W, M151I, M151Q, M151V, Q152A, Q152K, Q152S, D153I, D153K, D153M, D153W, G155F, G155H, G155W, G155Y, I156C, I156F, I156M, I156Q, I156R, I156S, I156V, P158A, P158G, P158S, N159G, N159T, R160A, R160G, R160H, R160N, R160W, D161G, D161I, D161K, D161L, D161M, D161N, D161Q, D161R, D161S, D161V, D161W, A162G, Q163G, Q163L, Q163M, Q163S, P164A, P164C, P164K, P164L, P164M, P164N, P164R, P164T, P164W, F165G, F165H, F165S, F165W, F165Y, I166L, I166V, A167T, D168A, D168G, D168H, D168P, D168R, D168T, W169A, W169E, W169K, W169M, W169Q, W169R, W169S, W169T, W169V, M170A, M170F, M170V, A171I, Q173N, Q173W, Q173Y, L174Q, L174W, Q175I, Q175Y, P176H, P176K, P176L, P176R, P176W, P176Y, V178A, V178T, V178W, N179H, N179R, N179T, N179V, N179Y, H180G, H180R, H180S, H180W, D181A, D181H, D181I, D181L, D181Q, D181R, D181S, D181W, S182A, S182E, S182G, S182I, S182K, S182L, S182P, S182Q, S182R, e/ou S182T, caracterizado pelo fato dos números nas designações de mutação de substituição se referirem a posições de aminoácidos de SEQ ID NO:31. A especificidade de substrato aumentada para, e/ou atividade aumentada no que diz respeito a substratos C_{14} podem ser medidas *in vitro* e/ou *in vivo*.

Em uma concretização da invenção, uma tioesterase mutante (ou uma equivalente desta que ocorre na natureza) é provida, que apresenta uma preferência por substratos éster (*ex.*, acil-PNP) sobre substratos tioéster (*ex.*, acil-CoA), e que é uma variante de uma precursora tioesterase que contém uma sequência análoga a SEQ ID NO:31, caracterizado pelo fato da tioesterase precursora ser mutada em uma ou mais posições de aminoácidos correspondendo a resíduos selecionados dentre 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101,

102, 104, 105, 106, 107, 108, 109, e/ou 110 de SEQ ID NO:31. A preferência por substratos éster sobre substratos tioéster pode ser medida *in vitro* e/ou *in vivo*.

Em uma concretização da invenção, uma tioesterase mutante (ou uma equivalente desta que ocorre na natureza) é provida, que apresenta uma preferência por substratos éster (*ex.*, acil-PNP) sobre substratos tioéster (*ex.*, acil-CoA), e que é uma variante de uma precursora tioesterase que contém uma sequência análoga a SEQ ID NO:31, caracterizado pelo fato da tioesterase precursora ser mutada em uma ou mais substituições selecionada dentre V95L, V95M, V95T, K96A, K96L, K96W, K96Y, A97F, A97K, A97S, A97T, A97W, A98E, A98F, A98K, A98L, A98Q, A98W, N99Y, A100K, A100V, E101L, P102S, L104C, M105F, Q106A, Q106C, Q106T, Q106Y, I107A, I107C, I107G, I107L, I107M, I107Q, I107V, R108A, R108C, R108D, R108F, R108I, R108L, R108S, R108V, R108W, R108Y, L109M, L109V, P110A,P110F, P110H, P110N, P110V, e/ou P110W, caracterizado pelo fato dos números nas designações de mutação de substituição se referirem a posições de aminoácidos de SEQ ID NO:31. A preferência por substratos éster sobre substratos tioéster pode ser medida *in vitro* e/ou *in vivo*.

Em uma concretização da invenção, uma tioesterase mutante (ou uma equivalente desta que ocorre na natureza) é provida, que apresenta uma preferência por substratos tioéster (*ex.*, acil-CoA) sobre substratos éster (*ex.*, acil-PNP), e que é uma variante de uma tioesterase precursora que contém uma sequência análoga a SEQ ID NO:31, caracterizado pelo fato da tioesterase precursora ser mutada em uma ou mais posições de aminoácidos correspondendo aos resíduos selecionados dentre 95, 96, 97, 101, 102, 103,104,

105, 107, 109, e/ou 110 de SEQ ID NO:31. A preferência por substratos tioéster sobre substratos éster pode ser medida *in vitro* e/ou *in vivo*.

Em uma concretização da invenção, uma tioesterase mutante (ou uma equivalente desta que ocorre na natureza) é provida, que apresenta uma preferência por substratos tioéster (*ex.*, acil-CoA) sobre substratos éster (*ex.*, acil-PNP), e que é uma variante de uma tioesterase precursora que contém uma sequência análoga a SEQ ID NO:31, caracterizado pelo fato da tioesterase precursora ser mutada em uma ou mais substituições selecionadas dentre V95E, V95I, V95W, V95Y, K96P, A97E, A97M, E101P, P102D, P102K, P102Y, L103E, L103K, L103N, L104A, L104D, L104E, L104N, L104Q, L104W, L104Y, M105W, I107E, I107K, I107P, L109A, L109C,L109D, L109E, L109G, L109K, L109N, L109P, L109Q, L109S, L109T, L109Y, e/ou P110R, caracterizado pelo fato dos números nas designações de mutação de substituição se referirem a posições de aminoácidos de SEQ ID NO:31. A preferência por substratos tioéster sobre substratos éster pode ser medida *in vitro* e/ou *in vivo*.

Em uma concretização da invenção, uma tioesterase mutante (ou uma equivalente desta que ocorre na natureza) é provida, que é capaz de gerar uma produtividade aumentada proporcional ou de porcentagem de ésteres graxos sobre outros produtos ésteres não graxos (*ex.*, ácidos graxos livres e/ou derivados de ácidos graxos com exceção de ésteres graxos), e que é uma variante de uma tioesterase precursora que contém uma sequência análoga a SEQ ID NO:31, caracterizada pelo fato da tioesterase precursora ser mutada em uma ou mais posições de aminoácidos correspondendo a resíduos de SEQ ID NO:31 selecionados dentre 1-14, 22-29, 33-

58, 65-100, 103-109, 114-117, 119-121, 127-136, 139-144, 150-151, 155-170, e/ou 173-174. A produtividade aumentada proporcional ou de porcentagem de ésteres graxos sobre outros produtos (*ex.*, derivados de ácido graxo com exceção de ésteres graxos) pode ser observada ou determinada *in vitro* e/ou *in vivo*. Preferencialmente, a produtividade aumentada proporcional ou de porcentagem de ésteres graxos sobre outros produtos é determinada *in vivo*.

Em uma concretização da invenção, uma tioesterase mutante (ou uma equivalente desta que ocorre na natureza) é provida, que é capaz de gerar uma produtividade aumentada proporcional ou de porcentagem de ésteres graxos sobre outros produtos ésteres não graxos (*ex.*, ácidos graxos livres e/ou derivados de ácidos graxos com exceção de ésteres graxos), e que é uma variante de uma tioesterase precursora que contém uma sequência análoga a SEQ ID NO:31, caracterizada pelo fato da tioesterase precursora ser mutada em uma ou mais posições de aminoácidos correspondendo a resíduos de SEQ ID NO:31 selecionados dentre 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 13, 14, 22, 23, 24, 25, 26, 28, 29, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 44, 45, 46, 47, 49, 50, 53, 58, 65, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 79, 81, 84, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 95, 96, 99, 100, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 114, 115, 117, 119, 120, 121, 127, 128, 129, 131, 132, 134, 135, 136, 139, 141, 142, 143, 144, 150, 151, 155, 156, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 169, 170, 173, e/ou 174. A produtividade aumentada proporcional ou de porcentagem de ésteres graxos sobre outros produtos (*ex.*, derivados de ácido graxo com exceção de ésteres graxos) pode ser observada ou determinada *in vitro* e/ou *in vivo*. Preferencialmente, a

produtividade aumentada proporcional ou de porcentagem de ésteres graxos sobre outros produtos é determinada *in vivo*.

Em uma concretização da invenção, uma tioesterase mutante (ou uma equivalente desta que ocorre na natureza) é provida, que é capaz de gerar uma produtividade aumentada proporcional ou de porcentagem de ésteres graxos sobre outros produtos ésteres não graxos (*ex.*, ácidos graxos livres e/ou derivados de ácidos graxos com exceção de ésteres graxos), e que é uma variante de uma tioesterase precursora que contém uma sequência análoga a SEQ ID NO:31, caracterizada pelo fato da tioesterase precursora ser mutada em uma ou mais substituições selecionadas dentre A1R, D2H, D2R, L4G, L4M, L5Q, I6A, I6L, L7E, G8A, S12N, A13I, A13L, A13S, A13T, A13W, A13Y, G14K, G14R, G14S, G14T, A22D, A22E, A22H, A22Y, W23Y, P24C, P24G, P24T, A25P, L26C, L26D, L26E, L26G, L26N, N28A, N28M, D29V, S33G, S33M, K34A, K34H, K34M, T35G, T35M, S36A, V37A, V37G, V37H, V37S, V38D, V38G, V38P, N39E, N39Q, N39R, A40M, A40P, S41T, G44F, G44Y, D45P, D45Q, T46W, S47F, Q49I, G50A, G50K, G50M, G50S, R53S, L58D, L58M, L58R, W65L, L67G, V68G, V68M, V68N, E69P, E69Q, L70A, L70E, L70H, G71C, G72A, N73C, N73G, N73L, N73R, N73T, N73V, D74C, D74S, D74W, G75A, G75K, G75L, G75M, L76A, L76F, L76G, L76I, L76M, L76N, L76T, L76W, R77G, F79A, F79M, F79P, P81E, P81W, T84F, T84H, T84Y, Q86P, Q86W, T87M, T87S, T87W, L88C, L88F, L88G, L88H, L88Y, R89G, Q90P, Q90W, I91M, I91S, L92C, L92G, Q93F, Q93P, V95A, V95D, V95E, V95L, V95M, K96P, N99L, N99M, N99S, A100D, A100K, A100L, A100M, A100V, A100Y, L103A, L104A, L104C, L104P, L104Q, L104W, M105A, Q106A, Q106C, Q106T, Q106W, I107C, I107M, R108E, L109F, L109M, G114F, R115W, Y117P, E119D, E119P, A120P, F121A, F121C, F121W, K127P, L128F, A129L, A129Y, E131A, F132P, V134P, P135A, L136A, F139M, M141A, M141P, E142A, E143P,

V144A, W150D, W150E, M151S, G155V, I156K, I156M, P158A, P158G, P158Q, P158S, N159E, N159I, R160H, R160I, R160K, D161G, A162T, A162Y, Q163A, Q163C, Q163E, Q163G, Q163I, Q163M, Q163S, Q163T, Q163V, P164C, F165D, F165S, I166A, I166L, W169M, M170E, M170G, M170N, M170S, Q173P, e/ou L174A, caracterizado pelo fato dos números nas designações de mutação de substituição se referirem a posições de aminoácidos de SEQ ID NO:31. A produtividade aumentada proporcional ou de porcentagem de ésteres graxos sobre outros produtos (*ex.*, derivados de ácido graxo com exceção de ésteres graxos) pode ser observada ou determinada *in vitro* e/ou *in vivo*. Preferencialmente, a produtividade aumentada proporcional ou de porcentagem de ésteres graxos sobre outros produtos é determinada *in vivo*.

Em uma concretização da invenção, uma tioesterase mutante (ou uma equivalente desta que ocorre na natureza) é provida, que é capaz de gerar uma produtividade diminuída proporcional ou de porcentagem de ésteres graxos sobre outros produtos (*ex.*, ácidos graxos livre e/ou derivados de ácidos graxos com exceção de ésteres graxos) quando a produção de éster graxo é indesejada, e que é uma variante de uma tioesterase precursora que contém uma sequência análoga a SEQ ID NO:31, caracterizada pelo fato da tioesterase precursora ser mutada em uma ou mais posições de aminoácidos correspondendo a resíduos de SEQ ID NO:31 selecionados dentre 3, 5, 15-18, 27-42, 46, 57-68, 77-78, 95-106, 121-123, 152-154, 167, e/ou 175-182. A produtividade diminuída proporcional ou de porcentagem de ésteres graxos sobre outros produtos (*ex.*, derivados de ácidos graxos com exceção de ésteres graxos) pode ser observada ou determinada *in vitro* e/ou *in vivo*. Preferencialmente, a produtividade diminuída

proporcional ou de porcentagem de ésteres graxos sobre outros produtos (*ex.*, derivados de ácido graxo com exceção de ésteres graxos) é determinada *in vivo*.

Em uma concretização da invenção, uma tioesterase mutante (ou uma equivalente desta que ocorre na natureza) é provida, que é capaz de gerar uma produtividade diminuída proporcional ou de porcentagem de ésteres graxos sobre outros produtos (*ex.*, ácidos graxos livre e/ou derivados de ácidos graxos com exceção de ésteres graxos) quando a produção de éster graxo é indesejada, e que é uma variante de uma tioesterase precursora que contém uma sequência análoga a SEQ ID NO:31, caracterizada pelo fato da tioesterase precursora ser mutada em uma ou mais posições de aminoácidos correspondendo ao resíduos de SEQ ID NO:31 selecionados dentre 3, 5, 15, 16, 18, 27, 28, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 40, 42, 46, 57, 59, 60, 62, 65, 68, 77, 78, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 102, 103, 105, 106, 121, 123, 152, 153, 154, 167, 175, 176, 178, 179, 180, 181, e/ou 182. A produtividade diminuída proporcional ou de porcentagem de ésteres graxos sobre outros produtos (*ex.*, derivados de ácidos graxos com exceção de ésteres graxos) pode ser observada ou determinada *in vitro* e/ou *in vivo*. Preferencialmente, a produtividade diminuída proporcional ou de porcentagem de ésteres graxos sobre outros produtos (*ex.*, derivados de ácido graxo com exceção de ésteres graxos) é determinada *in vivo*.

Em uma concretização da invenção, uma tioesterase mutante (ou uma equivalente desta que ocorre na natureza) é provida, que é capaz de gerar uma produtividade diminuída proporcional ou de porcentagem de ésteres graxos sobre outros produtos (*ex.*, ácidos

graxos livre e/ou derivados de ácidos graxos com exceção de ésteres graxos) quando a produção de éster graxo é indesejada, e que é uma variante de uma tioesterase precursora que contém uma sequência análoga a SEQ ID NO:31, caracterizada pelo fato da tioesterase precursora ser mutada em uma ou mais substituições selecionadas dentre T3E, T3G, T3K, T3L, L5C, L5G, Y15A, Y15L, Y15Q, Y15R, Y15V, R16D, R16E, R16G, R16I, R16V, S18E, L27V, N28G, N28I, S33I, S33R, K34R, T35F, T35K, T35L, T35Q, T35V, S36F, S36I, S36L, S36W, V37L, V38E, V38F, V38K, V38L, A40D, A40G, I42T, T46L, L57A, L57F, L57G, L57H, L57K, L57N, L57P, L57R, L57S, L57T, L57V, L57W, L57Y, K59V, Q60E, Q60P, Q62G, W65V, V68L, R77L, G78M, V95F, V95N, K96C, K96L, K96N, K96Q, K96R, K96Y, A97E, A97F, A97R, A97W, A98E, N99A, N99D, A100S, P102I, L103Q, L103W, M105L, Q106G, Q106H, Q106K, Q106S, Q106V, F121P, A123E, Q152D, Q152E, Q152F, Q152H, Q152I, Q152K, Q152L, Q152S, Q152T, Q152Y, D153P, D153V, D154E, A167V, Q175L, P176D, V178K, N179H, N179W, H180E, H180L, H180P, H180R, D181C, D181E, S182K, S182L, S182N, S182R, S182T, e/ou S182V, caracterizado pelo fato dos números nas designações de mutação de substituição se referirem a posições de aminoácidos de SEQ ID NO:31. A produtividade diminuída proporcional ou de porcentagem de ésteres graxos sobre outros produtos (*ex.*, derivados de ácidos graxos com exceção de ésteres graxos) pode ser observada ou determinada *in vitro* e/ou *in vivo*. Preferencialmente, a produtividade diminuída proporcional ou de porcentagem de ésteres graxos sobre outros produtos (*ex.*, derivados de ácido graxo com exceção de ésteres graxos) é determinada *in vivo*.

Em uma concretização da invenção, uma tioesterase mutante (ou uma equivalente desta que ocorre na natureza) é provida, que

é capaz de aumentar e/ou melhorar a produção de um ou mais derivados de ácido graxo, e que é uma variante de uma tioesterase precursora que contém uma sequência análoga a SEQ ID NO:31, caracterizado pelo fato da tioesterase precursora ser mutada em uma ou mais posições de aminoácidos correspondendo a resíduos de SEQ ID NO:31 selecionados dentre 2, 4, 11-22, 25-31, 37-45, 49-58, 63-80, 84-130, 136-146, e/ou 150-174. Um exemplo de derivado de ácido graxo que é produzido de acordo é um ácido graxo livre. A produção aumentada e/ou melhorada de derivados de ácido graxo pode ser medida *in vitro* e/ou *in vivo*. Preferencialmente, a produção aumentada e/ou melhorada de derivados de ácido graxo é medida *in vivo*.

Em uma concretização da invenção, uma tioesterase mutante (ou uma equivalente desta que ocorre na natureza) é provida, que é capaz de aumentar e/ou melhorar a produção de um ou mais derivados de ácido graxo, e que é uma variante de uma tioesterase precursora que contém uma sequência análoga a SEQ ID NO:31, caracterizado pelo fato da tioesterase precursora ser mutada em uma ou mais posições de aminoácidos correspondendo a resíduos de SEQ ID NO:31 selecionados dentre 2, 4, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 21, 22, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 37, 39, 41, 42, 43, 44, 45, 49, 50, 51, 53, 54, 58, 63, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 84, 87, 88, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 100, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 115, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 124, 127, 128, 129, 130, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 143, 144, 145, 146, 150, 151, 152, 154, 155, 156, 158, 162, 163, 166, 167, 169, 170, 173, e/ou 174. Um exemplo de derivado de ácido graxo que é produzido de acordo é um ácido graxo livre. A produção aumentada

e/ou melhorada de derivados de ácido graxo pode ser medida *in vitro* e/ou *in vivo*. Preferencialmente, a produção aumentada e/ou melhorada de derivados de ácido graxo é medida *in vivo*.

Em uma concretização da invenção, uma tioesterase mutante (ou uma equivalente desta que ocorre na natureza) é provida, que é capaz de aumentar e/ou melhorar a produção de um ou mais derivados de ácido graxo, e que é uma variante de uma tioesterase precursora que contém uma sequência análoga a SEQ ID NO:31, caracterizado pelo fato da tioesterase precursora ser mutada em uma ou mais substituições selecionadas dentre: D2L, D2P, D2R, L5G, L11I, S12N, S12T, A13N, G14C, G14P, G14S, G14T, G14V, Y15C, Y15I, Y15V, R16T, M17D, M17E, M17N, M17R, M17S, M17V, A19C, A21G, A22L, A22R, A22T, A25P, L26D, L26G, L26W, L27C, L27F, L27W, L27Y, N28I, N28P, D29P, K30P, W31D, W31G, W31N, W31P, W31R, W31S, W31T, V37Y, N39P, S41C, I42D, I42G, S43E, G44K, G44R, G44W, D45G, Q49E, G50A, G50K, G50M, G50Q, L51D, L51T, R53A, R53G, R53L, R53N, R53S, R53V, L54E, L54F, L54G, L54N, L54S, L54W, L58R, P63G, P63M, P63N, P63T, P63W, W65E, W65G, V66G, V66S, L67T, V68S, E69F, E69V, L70C, L70F, L70Q, L70S, L70T, L70V, G71A, N73G, N73L, D74A, D74C, G75A, G75C, G75F, G75R, G75W, L76I, R77A, R77C, R77D, R77F, R77G, R77H, R77K, R77L, R77N, R77Q, R77S, R77W, G78D, G78E, F79K, Q80G, T84H, T84N, T84Q, T87A, T87F, T87H, T87W, L88A, L88C, L88H, Q90N, Q90W, I91G, I91L, I91M, I91S, L92G, L92N, L92Q, L92S, L92T, L92Y, Q93P, D94P, V95F, V95N, V95Q, K96P, A97C, A97P, A98P, A98V, A100D, A100E, A100Q, A100Y, P102L, P102Q, P102R, L103E, L103K, L104A, L104Q, L104W, L104Y, M105C, M105E, M105F, M105L, Q106D, Q106G, Q106L, Q106V, Q106W, Q106Y, I107A, I107C, I107E, I107G, I107K, I107L, I107Q, I107S, I107T, R108G, L109F, L109V, L109Y, P110A, P110E, P110F, P110G, P110H, P110N, P110S, P110V, A111Y, N112F,

N112P, Y113D, Y113E, Y113P, R115W, Y117A, Y117D, Y117E, Y117G, Y117P, Y117Q, N118F, E119P, A120P, F121C, F121L, F121M, F121N, F121Q, F121R, F121V, F121W, F121Y, S122D, S122F, S122L, S122P, S122W, S122Y, I124A, I124G, I124H, I124K, I124R, K127P, L128S, A129I, A129W, A129Y, K130P, L136A, L136D, L136E, L136G, L136K, L136N, L136P, L136Q, L136S, L136T, L137A, L137C, L137H, L137K, L137Q, L137S, L137Y, P138F, F139L, F139M, F140C, F140I, F140L, F140M, F140V, M141T, E143P, V144H, Y145I, L146G, L146P, W150G, W150I, W150V, M151F, M151L, M151R, M151S, M151T, M151W, Q152N, Q152V, Q152Y, D154C, D154E, G155I, I156C, I156K, I156T, I156V, P158G, P158T, A162T, Q163A, Q163C, Q163E, Q163I, Q163S, Q163T, Q163V, I166C, A167E, A167F, A167L, A167N, A167R, A167V, A167Y, W169K, M170N, M170S, Q173D, L174A, L174T, e/ou L174W, caracterizado pelo fato dos números nas designações de mutação de substituição se referirem a posições de aminoácidos de SEQ ID NO:31. Um exemplo de derivado de ácido graxo que é produzido de acordo é um ácido graxo livre. A produção aumentada e/ou melhorada de derivados de ácido graxo pode ser medida *in vitro* e/ou *in vivo*. Preferencialmente, a produção aumentada e/ou melhorada de derivados de ácido graxo é medida *in vivo*.

Em uma concretização, uma tioesterase mutante (ou uma equivalente desta que ocorre na natureza) é provida, que é capaz de gerar uma produtividade aumentada proporcional ou de porcentagem de derivados de ácido graxo (*ex.*, ácidos graxos de cadeia curta, ésteres graxos de cadeia curta, alcoóis graxos de cadeia curta, etc.) de cadeia curta (*ex.*, C_8, C_9, C_{10}, C_{11}, C_{12}, C_{13}, C_{14}) X outros produtos (*ex.*, derivados de ácido graxo de cadeia não curta, incluindo, por exemplo, ácidos graxos de cadeia longa (*ex.*, C_{15}, C_{16}, C_{17}, C_{18}, C_{19}, C_{20}), ésteres graxos de cadeia

longa, alcoóis graxos de cadeia longa, etc.), e que é uma variante de uma tioesterase precursora que contém uma sequência análoga a SEQ ID NO:31, caracterizado pelo fato da tioesterase precursora ser mutada em uma ou mais posições de aminoácido correspondendo a um ou mais resíduos de SEQ ID NO:31 selecionado dentre 13, 16-17, 25-38, 55-67, 78-98, 105-119, 122, 126, 132-145, 153, e/ou 161-182. Um exemplo de derivado de ácido graxo de cadeia curta é um derivado de ácido graxo C_{12}. Um derivado de ácido graxo de cadeia curta alternativo é o derivado de ácido graxo C_{14}. Em algumas circunstâncias, a produtividade aumentada proporcional ou de porcentagem de derivado de ácido graxo de cadeia curta pode ser correlacionada a uma produtividade proporcional diminuída de derivados de ácido graxo de cadeia longa. A produtividade aumentada proporcional ou de porcentagem de derivados de ácido graxo de cadeia curta e/ou o decréscimo correspondente de produtividade proporcional ou de porcentagem de derivado de ácido graxo de cadeia longa pode ser medido *in vitro* ou *in vivo*. Preferencialmente, a produtividade proporcional aumentada de derivados de ácido graxo de cadeia curta ou o correspondente decréscimo de produtividade proporcional ou de porcentagem de derivados de ácido graxo de cadeia longa é medida *in vivo*.

Em uma concretização, uma tioesterase mutante (ou uma equivalente desta que ocorre na natureza) é provida, que é capaz de gerar uma produtividade aumentada proporcional ou de porcentagem de derivados de ácido graxo (*ex.*, ácidos graxos de cadeia curta, ésteres graxos de cadeia curta, alcoóis graxos de cadeia curta, etc.) de cadeia curta (*ex.*, C_8, C_9, C_{10}, C_{11}, C_{12}, C_{13}, C_{14}) X outros produtos (*ex.*, derivados de ácido graxo de

cadeia não curta, incluindo, por exemplo, ácidos graxos de cadeia longa, ésteres graxos de cadeia longa, alcoóis graxos de cadeia longa, etc.), e que é uma variante de uma tioesterase precursora que contém uma sequência análoga a SEQ ID NO:31, caracterizado pelo fato da tioesterase precursora ser mutada em um ou mais resíduos de SEQ ID NO:31 selecionados dentre 13, 16, 17, 25, 29, 31, 35, 36, 38, 55, 57, 58, 59, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 78, 79, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 89, 90, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 105, 106, 108, 111, 113, 114, 117, 119, 122, 126, 132, 135, 136, 139, 142, 144, 145, 153, 161, 162, 165, 168, 173, 175, 176, 178, 179, 180, 181, e/ou 182. Um exemplo de derivado de ácido graxo de cadeia curta é um derivado de ácido graxo C_{12}. Um derivado de ácido graxo de cadeia curta alternativo é o derivado de ácido graxo C_{14}. Em algumas circunstâncias, a produtividade aumentada proporcional ou de porcentagem de derivado de ácido graxo de cadeia curta pode ser correlacionada a uma produtividade proporcional diminuída de derivados de ácido graxo de cadeia longa. A produtividade aumentada proporcional ou de porcentagem de derivados de ácido graxo de cadeia curta e/ou o decréscimo correspondente de produtividade proporcional ou de porcentagem de derivado de ácido graxo de cadeia longa pode ser medido *in vitro* ou *in vivo*. Preferencialmente, a produtividade proporcional aumentada de derivados de ácido graxo de cadeia curta ou o correspondente decréscimo de produtividade proporcional ou de porcentagem de derivados de ácido graxo de cadeia longa é medida *in vivo*.

Em uma concretização, uma tioesterase mutante (ou uma equivalente desta que ocorre na natureza) é provida, que é capaz de gerar uma produtividade aumentada proporcional ou de

porcentagem de derivados de ácido graxo (*ex.*, ácidos graxos de cadeia curta, ésteres graxos de cadeia curta, alcoóis graxos de cadeia curta, etc.) de cadeia curta (*ex.*, C_8, C_9, C_{10}, C_{11}, C_{12}, C_{13}, C_{14}) X outros produtos (*ex.*, derivados de ácido graxo de cadeia não curta, incluindo, por exemplo, ácidos graxos de cadeia longa, ésteres graxos de cadeia longa, alcoóis graxos de cadeia longa, etc.), e que é uma variante de uma tioesterase precursora que contém uma sequência análoga a SEQ ID NO:31, caracterizado pelo fato da tioesterase precursora ser mutada em uma ou mais substituições selecionadas dentre: A13V, R16A, M17T, A25S, D29M, W31L, T35Y, S36W, V38S, P55A, P55G, L57I, L58M, L58V, K59E, H61W, Q62M, P63V, R64M, W65L, V66C, L67C, L67M, G78F, G78M, G78R, G78T, G78V, F79K, F79Y, Q82A, Q82M, Q82R, Q83G, Q83K, T84M, T84V, E85A, E85C, E85G, E85Q, E85S, E85T, E85V, E85W, E85Y, Q86H, Q86Y, T87R, R89V, Q90L, Q93M, Q93N, Q93V, D94C, D94L, V95G, K96C, A97N, A97V, A98G, A98Y, M105I, Q106K, Q106R, R108W, A111E, A111N, A111S, A111W, A111Y, Y113A, Y113S, Y113V, G114K, G114Y, Y117R, E119M, E119Q, E119R, S122F, S122I, S122M, S122R, P126K, F132C, F132D, F132K, F132L, F132N, F132V, P135A, P135E, P135K, P135Q, L136H, F139L, E142W, V144Y, Y145A, Y145C, Y145D, Y145E, Y145G, Y145I, Y145L, Y145M, Y145N, Y145R, Y145S, Y145T, D153K, D153Q, D161K, A162I, F165K, D168W, Q173I, Q175M, P176Q, P176R, P176V, V178F, V178G, V178L, V178R, V178S, V178T, N179H, H180E, H180P, H180R, H180S,H180V, H180W, D181R, D181T, S182C,S182D, S182G, e/ou S182R, caracterizado pelo fato dos números nas designações de mutação de substituição se referirem a posições de aminoácidos de SEQ ID NO:31. Um exemplo de derivado de ácido graxo de cadeia curta é um derivado de ácido graxo C_{12}. Um derivado de ácido graxo de cadeia curta alternativo é o derivado de ácido graxo

C_{14}. Em algumas circunstâncias, a produtividade aumentada proporcional ou de porcentagem de derivado de ácido graxo de cadeia curta pode ser correlacionada a uma produtividade proporcional diminuída de derivados de ácido graxo de cadeia longa. A produtividade aumentada proporcional ou de porcentagem de derivados de ácido graxo de cadeia curta e/ou o decréscimo correspondente de produtividade proporcional ou de porcentagem de derivado de ácido graxo de cadeia longa pode ser medido *in vitro* ou *in vivo*. Preferencialmente, a produtividade proporcional aumentada de derivados de ácido graxo de cadeia curta ou o correspondente decréscimo de produtividade proporcional ou de porcentagem de derivados de ácido graxo de cadeia longa é medida *in vivo*.

Em uma concretização, uma tioesterase mutante (ou uma equivalente desta que ocorre na natureza) é provida, que é capaz de gerar uma produtividade diminuída proporcional ou de porcentagem de derivados de ácidos graxos (*ex.*, ácidos graxos de cadeia curta, ésteres graxos de cadeia curta, alcoóis graxos de cadeia curta, etc.) de cadeia curta (*ex.*, C_8, C_9, C_{10}, C_{11}, C_{12}, C_{13}, C_{14}) X outros produtos (*ex.*, derivados de ácido graxo de cadeia não curta, incluindo, por exemplo, ácidos graxos de cadeia longa (*ex.*, C_{15}, C_{16}, C_{17}, C_{18}, C_{19}, C_{20}), ésteres graxos de cadeia longa, alcoóis graxos de cadeia longa, etc.), e que é uma variante de uma tioesterase precursora que contém uma sequência análoga a SEQ ID NO:31, caracterizado pelo fato da tioesterase precursora ser mutada em uma ou mais posições de aminoácido correspondendo a um ou mais resíduos de SEQ ID NO:31 selecionado dentre 1-31, 36-81, 84-159, 162-177, e/ou 181. Um exemplo de derivado de ácido graxo de cadeia curta é um derivado de ácido

graxo C_{12}. Um derivado de ácido graxo de cadeia curta alternativo é o derivado de ácido graxo C_{14}. Em algumas circunstâncias, a produtividade diminuída proporcional ou de porcentagem de derivado de ácido graxo de cadeia curta pode ser correlacionada a uma produtividade proporcional aumentada de derivados de ácido graxo de cadeia longa. A produtividade diminuída proporcional ou de porcentagem de derivados de ácido graxo de cadeia curta e/ou o aumento correspondente de produtividade proporcional ou de porcentagem de derivado de ácido graxo de cadeia longa pode ser medido *in vitro* ou *in vivo*. Preferencialmente, a produtividade proporcional diminuída de derivados de ácido graxo de cadeia curta ou o correspondente aumento de produtividade proporcional ou de porcentagem de derivados de ácido graxo de cadeia longa é medida *in vivo*.

Em uma concretização, uma tioesterase mutante (ou uma equivalente desta que ocorre na natureza) é provida, que é capaz de gerar uma produtividade diminuída proporcional ou de porcentagem de derivados de ácidos graxos (*ex.*, ácidos graxos de cadeia curta, ésteres graxos de cadeia curta, alcoóis graxos de cadeia curta, etc.) de cadeia curta (*ex.*, C_8, C_9, C_{10}, C_{11}, C_{12}, C_{13}, C_{14}) X outros produtos (*ex.*, derivados de ácido graxo de cadeia não curta, incluindo, por exemplo, ácidos graxos de cadeia longa, ésteres graxos de cadeia longa, alcoóis graxos de cadeia longa, etc.), e que é uma variante de uma tioesterase precursora que contém uma sequência análoga a SEQ ID NO:31, caracterizado pelo fato da tioesterase precursora ser mutada em uma ou mais posições de aminoácidos correspondendo a um ou mais resíduos de SEQ ID NO:31 selecionados dentre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 24, 26, 27, 30, 31,

36, 37, 38, 42, 44, 45, 46, 47, 48, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 57, 61, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 81, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 99, 100, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 124, 125, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 162, 163, 165, 166, 167, 168, 170, 171, 173, 174, 175, 176, 177, e/ou 181. Um exemplo de derivado de ácido graxo de cadeia curta é um derivado de ácido graxo C_{12}. Um derivado de ácido graxo de cadeia curta alternativo é o derivado de ácido graxo C_{14}. Em algumas circunstâncias, a produtividade diminuída proporcional ou de porcentagem de derivado de ácido graxo de cadeia curta pode ser correlacionada a uma produtividade proporcional aumentada de derivados de ácido graxo de cadeia longa. A produtividade diminuída proporcional ou de porcentagem de derivados de ácido graxo de cadeia curta e/ou o aumento correspondente de produtividade proporcional ou de porcentagem de derivado de ácido graxo de cadeia longa pode ser medido *in vitro* ou *in vivo*. Preferencialmente, a produtividade proporcional diminuída de derivados de ácido graxo de cadeia curta ou o correspondente aumento de produtividade proporcional ou de porcentagem de derivados de ácido graxo de cadeia longa é medida *in vivo*.

Em uma concretização, uma tioesterase mutante (ou uma equivalente desta que ocorre na natureza) é provida, que é capaz de gerar uma produtividade diminuída proporcional ou de porcentagem de derivados de ácidos graxos (*ex.*, ácidos graxos de cadeia curta, ésteres graxos de cadeia curta, alcoóis graxos de

cadeia curta, etc.) de cadeia curta (*ex.*, C_8, C_9, C_{10}, C_{11}, C_{12}, C_{13}, C_{14}) X outros produtos (*ex.*, derivados de ácido graxo de cadeia não curta, incluindo, por exemplo, ácidos graxos de cadeia longa, ésteres graxos de cadeia longa, alcoóis graxos de cadeia longa, etc.), e que é uma variante de uma tioesterase precursora que contém uma sequência análoga a SEQ ID NO:31, caracterizado pelo fato da tioesterase precursora ser mutada em uma ou mais substituições selecionadas dentre: A1C, A1F, A1L, A1Y, D2L, D2M, D2P, D2W, T3R, L4A, L4M, L4N, L4S, L4V, L4Y, L5E, L5F, L5G, L5K, L5N, L5S, L5W, I6T, L7A, L7E, L7K, L7M, L7W, G8K, D9N, D9T, L11A, L11C, L11I, L11M, L11Q, L11V, S12I, S12L, S12M, S12N, S12T, S12V, S12Y, A13C, G14C, G14E, G14I, G14M, G14N, G14P, G14S, G14T, G14V, Y15C, Y15E, Y15G, Y15I, Y15N, Y15V, R16T, M17D, M17E, M17G, M17L, M17N, M17P, M17R, M17S, M17V, S18M, S18N, S18T, A19E, A19L, A19V, A21P, A22D, A22E, A22F, A22H, A22I, A22K, A22L, A22P, A22R, A22S, A22T, A22Y, W23A, W23H, W23N, W23P, P24A, P24C, P24D, P24E, P24F, P24G, P24I, P24M, P24N, P24S, P24T, P24V, P24W, L26P, L27A, L27C, L27F, L27H, L27R, L27S, L27T, L27W, L27Y, K30P, W31D, W31P, W31R, S36F, S36L, V37G, V37H, V37N, V37Q, V37W, V37Y, V38P, N39E, N39G, N39K, N39M, N39P, N39Q, N39Y, I42D, I42G, I42P, G44A, G44E, G44K, G44M, G44N, G44R, G44S, G44W, G44Y, D45G, D45M, T46D, S47E, S47P, S47Q, S47R, S47Y, Q48Y, G50C, G50E, G50F, G50I, G50K, G50L, G50M, G50N, G50P, G50Q, G50R, G50S, G50T, G50W, G50Y, L51D, L51P, L51T, A52P, R53A, R53C, R53D, R53E, R53F, R53G, R53I, R53K, R53L, R53N, R53S, R53T, R53V, R53W, R53Y, L54C, L54E, L54G, L54N, L54Y, P55Y, L57P, H61A, H61D, H61E, P63D, P63E, P63G, P63K, P63M, P63N, P63Q, P63R, R64L, W65G, W65P, W65R, V66N, V66Q, V66S, V66W, V66Y, L67E, L67G, L67Q, L67R, L67S, L67W, V68E, V68G, V68N, V68P, V68Q, E69A, E69C, E69D, E69F, E69G, E69H, E69K, E69L, E69M, E69N, E69P, E69Q,

E69S, E69V, E69W, E69Y, L70A, L70C, L70E, L70F, L70G, L70H, L70K, L70Q, L70S, L70T, L70W, G71C, G71S, G72A, G72M, G72P, N73A, N73G, N73H, N73I, N73L, N73P, N73R, N73S, N73T, N73W, D74A, D74C, D74F, D74G, D74Q, D74S, D74W, D74Y, G75A, G75C, G75D, G75E, G75F, G75I, G75K, G75L, G75M, G75N, G75P, G75R, G75T, G75V, G75W, G75Y, L76A, L76C, L76D, L76E, L76F, L76G, L76I, L76K, L76M, L76N, L76P, L76Q, L76R, L76T, L76V, L76W, R77A, R77C, R77D, R77E, R77F, R77G, R77H, R77N, R77S, R77V, R77W, G78A, G78C, G78D, G78E, G78N, G78P, G78Q, G78Y, F79P, F79Q, F79S, F79V, P81E, P81W, T84D, T84E, T84G, T84H, T84K, T84L, T84N, T84Q, T84R, T84W, T84Y, E85F, E85P, Q86A, T87F, L88A, L88E, L88G, L88H, L88Q, L88S, L88W, L88Y, R89P, Q90P, Q90W, I91E, I91L, I91M, I91N, I91Q, I91S, I91Y, L92C, L92E, L92G, L92H, L92N, L92Q, L92R, L92S, L92Y, Q93P, D94P, D94V, V95A, V95C, V95D, V95E, V95F, V95I, V95P, V95Q, V95W, V95Y, K96P, A97C, A97P, N99D, A100Q, A100Y, P102E, P102G, P102H, P102L, P102R, P102V, P102W, L103C, L103E, L103I, L103K, L103N, L103R, L103S, L103T, L103V, L104A, L104C, L104E, L104G, L104I, L104N, L104P, L104Q, L104S, L104W, L104Y, M105A, M105C, M105E, M105F, M105G, M105K, M105L, M105P, M105T, M105W, Q106D, Q106G, Q106H, Q106L, Q106W, I107A, I107E, I107F, I107G, I107K, I107L, I107Q, I107S, I107T, I107Y, R108A, R108C, R108D, R108E, R108F, R108G, R108H, R108I, R108L, R108M, R108S, R108V, R108Y, L109C, L109F, L109G, L109K, L109Q, L109R, L109T, L109V, L109Y, P110A, P110C, P110D, P110E, P110F, P110G, P110H, P110K, P110L, P110M, P110N, P110R, P110S, P110V, P110W, A111C, A111L, A111P, A111Q, A111R, A111V, N112I, N112L, N112P, N112Y, Y113D, Y113E, Y113Q, G114A, R115W, Y117D, Y117G, Y117P, N118F, E119C, E119L, A120P, F121A, F121C, F121D, F121E, F121G, F121K, F121L, F121N, F121P, F121Q, F121R, F121S, F121V, F121W, F121Y, S122D, S122E, S122L, S122P, I124D, I124E, I124G,

I124H, I124K, I124R, I124W, I124Y, Y125C, Y125G, Y125H, Y125I, Y125L, Y125P, Y125Q, Y125R, Y125S, Y125T, Y125V, K127A, L128E, L128F, L128G, L128K, L128Q, L128R, L128S, L128W, A129D, A129F, A129L, A129W, A129Y, K130P, K130V, E131A, E131C, E131D, E131P, E131V, F132P, D133C, V134C, V134D, V134N, V134P, V134W, L136A, L136D, L136E, L136G, L136N, L136P, L136T, L137D, L137E, L137G, L137H, L137K, L137P, L137Q, L137R, L137S, P138G, P138N, P138V, F139A, F139C, F139D, F139E, F139G, F139H, F139M, F139N, F139S, F139T, F139V, F139W, F140A, F140C, F140G, F140I, F140L, F140M, F140N, F140P, F140S, F140T, F140V, F140W, M141C, M141D, M141E, M141F, M141G, M141K, M141L, M141P, M141Q, M141R, M141T, M141W, M141Y, E142A, E142C, E142G, E142I, E142L, E142M, E142P, E142Q, E142R, E142T, E142V, E143A, E143D, E143F, E143G, E143I, E143M, E143P, E143W, V144A, V144D, V144E, V144G, V144H, V144N, V144P, V144Q, V144R, V144S, Y145Q, Y145W, L146C, L146P, W150P, W150R, M151A, M151C, M151D, M151E, M151F, M151G, M151I, M151L, M151Q, M151R, M151S, M151T, M151V, M151W, Q152P, D153A, D153E, D153F, D154A, D154C, D154E, D154F, D154G, D154H, D154I, D154K, D154L, D154M, D154N, D154P, D154R, D154S, D154T, D154V, D154W, G155A, G155P, G155V, I156A, I156C, I156E, I156F, I156G, I156K, I156M, I156Q, I156R, I156S, I156T, I156Y, H157C, H157E, P158F, P158H, P158I, P158L, P158Q, P158V, P158W, N159P, N159W, A162K, A162L, A162N, A162R, A162Y, Q163A, Q163D, Q163E, Q163F, Q163I, Q163V, Q163W, Q163Y, F165L, I166A, I166F, I166M, I166S, I166Y, A167C, A167D, A167E, A167F, A167L, A167N, A167R, A167V, A167W, A167Y, D168M, D168R, M170E, M170F, M170G, M170N, M170S, M170T, A171S, Q173D, Q173P, L174A, L174G, L174S, L174T, L174W, L174Y, Q175F, P176L, P176Y, L177F, L177M, L177S, D181C, D181E, e/ou D181G, caracterizado pelo fato dos números nas designações de mutação

de substituição se referirem a posições de aminoácidos de SEQ ID NO:31. Um exemplo de derivado de ácido graxo de cadeia curta é um derivado de ácido graxo C_{12}. Um derivado de ácido graxo de cadeia curta alternativo é o derivado de ácido graxo C_{14}. Em algumas circunstâncias, a produtividade diminuída proporcional ou de porcentagem de derivado de ácido graxo de cadeia curta pode ser correlacionada a uma produtividade proporcional aumentada de derivados de ácido graxo de cadeia longa. A produtividade diminuída proporcional ou de porcentagem de derivados de ácido graxo de cadeia curta e/ou o aumento correspondente de produtividade proporcional ou de porcentagem de derivado de ácido graxo de cadeia longa pode ser medido *in vitro* ou *in vivo*. Preferencialmente, a produtividade proporcional diminuída de derivados de ácido graxo de cadeia curta ou o correspondente aumento de produtividade proporcional ou de porcentagem de derivados de ácido graxo de cadeia longa é medida *in vivo*.

Em uma concretização da invenção, um polinucleotídeo (ou um gene) codificando uma tioesterase mutante (ou uma equivalente desta que ocorre na natureza) da invenção é provido. Em outra concretização da invenção, um vetor é provido contendo o polinucleotídeo (ou o gene) de acordo com a invenção.

Em uma concretização da invenção, a tioesterase precursora é codificada por um gene que é capaz de hibridizar seletivamente com a sequência polinucleotídica de *'tesA,* ou um ortólogo, parálogo ou homólogo deste. O ANEXO 13 lista os Números de Acesso do GenBank de homólogos de proteínas de 'TesA apresentando pelo menos 40% de identidade de sequência de aminoácidos com 'TesA.

A tioesterase precursora pode ser codificada por um polinucleotídeo que é capaz de hibridizar seletivamente sob condições de estringência intermediária, sob alta estringência, ou sob estringência máxima.

Em uma concretização da invenção, um polinucleotídeo codificando uma tioesterase precursora contém uma sequência de aminoácido de 'TesA, um ortólogo deste, um parálogo, deste, ou um homólogo deste. Por exemplo, a tioesterase precursora contém a sequência de aminoácidos de uma 'TesA obtida de uma *E.coli*, tal como uma *E.coli K12*. Em uma concretização particular, um polinucleotídeo codificando a tioesterase precursora é provido caracterizado pelo fato da tioesterase precursora conter uma sequência de aminoácidos, uma variante, ou um fragmento de SEQ ID NO:31. Em uma concretização particular, o gene codificando a tioesterase precursora contém a sequência polinucleotídica de SEQ ID NO:32, ou um fragmento deste.

Em uma concretização da invenção, um polinucleotídeo codificando uma tioesterase precursora é provida caraterizada pelo fato da tioesterase precursora consistir de uma proteína apresentando pelo menos por volta de 20%, por exemplo, pelo menos por volta de 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade com a sequência SEQ ID NO:31. Em uma concretização, um polinucleotídeo é provido caracterizado pelo fato da tioesterase precursora consistir de uma proteína apresentando pelo menos por volta de 20%, por exemplo, pelo menos por volta de 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%,

ou 100% de identidade com a sequência de uma 'TesA de *E.coli K12*. Em uma concretização da invenção, um polinucleotídeo é provido, que contém uma sequência apresentando pelo menos por volta de 20%, por exemplo, pelo menos por volta de 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade com SEQ ID NO:32 in **FIG. 59.**

Em uma concretização da invenção, um vetor é provido que contém um gene (ou um polinucleotídeo) codificando uma tioesterase mutante ou uma equivalente desta que ocorre na natureza. Vetores de acordo com a invenção podem ser transformados em células hospedeiras apropriadas para produzir células hospedeiras recombinantes.

Em uma concretização da invenção, uma sonda é provida que contém um polinucleotídeo de por volta de 4 a por volta de 150 nucleotídeos de comprimento, que é substancialmente idêntico a um fragmento correspondente de SEQ ID NO:32, caracterizado pelo fato da sonda ser útil para a detecção e/ou identificação de sequências polinucleotídicas codificando enzimas que apresentam atividade de tioesterase. Uma sonda de acordo com a invenção pode ser utilizada para detectar e isolar potenciais tioesterases precursoras de fontes não conhecidas para produzir tais tioesterases precursoras ou para as quais a sequência de aminoácidos ou nucléica é desconhecida.

Em certas concretizações da invenção, uma célula hospedeira recombinante é provida contendo um polinucleotídeo codificando uma tioesterase mutante ou uma equivalente desta que ocorre na natureza. Em uma concretização, técnicas conhecidas de alteração

ou modificação genômica podem ser empregadas para alterar ou modificar as tioesterases endógenas da célula hospedeira, efetuando uma ou mais das mutações previamente mencionadas, de modo que pelo menos uma das tioesterases endógenas mutantes apresenta pelo menos uma propriedade alterada. Em outra concretização, a célula hospedeira recombinante é engenheirada para incluir um plasmídeo contendo um polinucleotídeo codificando uma tioesterase mutante ou uma equivalente desta que ocorre na natureza. Em ainda outra concretização, a célula hospedeira recombinante expressa a tioesterase após o polinucleotídeo codificando a tioesterase ser integrado no cromossomo da célula hospedeira.

Em uma concretização da invenção, a célula hospedeira recombinante da invenção pode ser selecionada a partir de qualquer célula capaz de expressar uma construção gênica recombinante, e pode ser selecionada a partir de célula microbiana, vegetal ou animal. Em uma concretização particular, a célula hospedeira é de origem bacteriana, de cianobactéria, fúngica, de levedura, de alga, humana ou de mamífero. Em uma concretização particular, a célula hospedeira é selecionada a partir de qualquer uma das espécies de bactéria Gram positivas tais como *Actinomycetes; Bacillaceae,* incluindo *Bacillus alkalophilus, Bacillus subtilis, Bacillus licheniformis, Bacillus lentus, Bacillus brevis, Bacillus stearothermophilus, Bacillus alkalophilus, Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus coagulans, Bacillus circulans, Bacillus lautus, Bacillus megaterium, B. thuringiensis; Brevibacteria sp.,* incluindo *Brevibacterium flavum, Brevibacterium lactofermentum, Brevibacterium ammoniagenes, Brevibacterium butanicum,*

Brevibacterium divaricatum, Brevibacterium healii, Brevibacterium ketoglutamicum, Brevibacterium ketosoreductum, Brevibacterium lactofermentum, Brevibacterium linens, Brevibacterium paraffinolyticum; Corynebacterium spp. tais como *C. glutamicum* e *C. melassecola, Corynebacterium herculis, Corynebacterium lilium, Corynebactertium acetoacidophilum, Corynebacterium acetoglutamicum, Corynebacterium acetophilum, Corynebacterium ammoniagenes, Corynebacterium fujiokense, Corynebacterium nitrilophilus;* ou espécies bacterianas de ácido lático incluindo *Lactococcus spp.* tais como *Lactococcus lactis; Lactobacillus spp.* incluindo *Lactobacillus reuteri; Leuconostoc spp.; Pediococcus spp.; Serratia spp.* tais como *Serratia marcescens;* espécies *Streptomyces,* tais como *Streptomyces lividans, Streptomyces murinus, S. coelicolor* e *Streptococcus spp.*. Alternativamente, cepas de espécies de bactérias Gram negativas pertencendo a *Enterobacteriaceae* incluindo *E. coli, Cellulomonas spp.;* ou a *Pseudomonadaceae* incluindo *Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas alcaligenes, Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas putida, Pseudomonas syringae* e *Burkholderia cepacia, Salmonella sp., Stenotrophomonas spp.,* e *Stenotrophomonas maltophilia.* Microorganismos oleaginosos tais como *Rhodococcus spp, Rhodococcus opacus, Ralstonia spp.,* e *Acetinobacter spp.* São úteis também. Além disso, leveduras e cepas de fungos filamentosos podem ser células hospedeiras úteis, incluindo *Absidia spp.; Acremonium spp.; Agaricus spp.; Anaeromyces spp.; Aspergillus spp.,* incluindo *A. aculeatus, A. awamori, A. flavus, A. foetidus, A. fumaricus, A. fumigatus, A. nidulans, A. niger, A. oryzae, A. terreus; A. tubingensis* e *A. versicolor; Aeurobasidium spp.; Cephalosporum spp.; Chaetomium spp.;*

Coprinus spp.; Dactyllum spp.; Fusarium spp., incluindo *F. conglomerans, F. decemcellulare, F. javanicum, F. lini, F. oxysporum* e *F. solani; Gliocladium spp.; Kluyveromyces sp.; Hansenula sp.; Humicola spp.*, including *H. insolens* e *H. lanuginosa; Hypocrea spp.; Mucor spp.; Neurospora spp.*, including *N. crassa* e *N. sitophila; Neocallimastix spp.; Orpinomyces spp.; Penicillium spp.; Phanerochaete spp.; Phlebia spp.; Pichia sp.; Piromyces spp.; Rhizopus spp.;* espécies de *Rhizomucor* tais como *Rhizomucor miehei; Schizophyllum spp.; Schizosaccharomyces* tais como, por exemplo, espécies de *S. pombe; chytalidium sp., Sulpholobus sp., Thermoplasma sp., Thermomyces sp.; Trametes spp.; Trichoderma spp.*, incluindo *T. reesei, T. reesei (longibrachiatum)* e *T. viride; Yarrowinia sp.;* e *Zygorhynchus spp* e em particular inclui leveduras oleaginosas somente *Phafia spp., Rhorosporidium toruloides Y4, Rhodotorula Glutinis* e *Candida 107*.

Em uma concretização da invenção, uma célula hospedeira recombinante é provida, que expressa ou super-expressa um gene codificando uma tioesterase mutante (ou uma equivalente desta que ocorre na natureza), e que também expressa (ou super-expressa) um ou mais genes codificando uma ou mais enzimas que utilizam, como um substrato, produtos de reação da tioesterase mutante (*ex.*, ácidos graxos, acil-CoAs graxos, ésteres acil-fosfato graxos, aldeídos graxos, ésteres graxos, ou alcoóis graxos) ou produtos de reação de uma ou mais outras enzimas que são parte de uma via metabólica, incluindo produtos de reação da tioesterase mutante (*ex.*, ácidos graxos) como precursores e/ou substratos.

Em uma concretização da invenção, uma célula hospedeira recombinante é provida, que expressa ou super-expressa um gene codificando uma tioesterase mutante (ou uma equivalente desta que ocorre na natureza) e que também expressa (ou super-expressa) um ou mais genes codificando uma ou mais enzimas que reagem com um substrato que é necessário como um precursor para uma reação em uma via sintética de ácido graxo. Em uma concretização particular, a célula hospedeira recombinante inclui um gene que codifica tioesterase e um gene que codifica um gene que codifica uma enzima que reage com um substrato que é necessário como um precursor para uma reação em uma via sintética de ácido graxo, que contém a super-expressão ou modificação de um gene selecionado dentre *pdh*, *panK*, *aceEF*, *fabH*, *fabD*, *fabG*, *acpP*, e/ou *fabF*.

Em uma concretização da invenção, uma célula hospedeira recombinante contém um gene (ou um polinucleotídeo) que codifica uma tioesterase mutante (ou uma equivalente desta que ocorre na natureza) e que também contém a atenuação ou deleção de um gene que reduz o fluxo de carbono, ou um gene que compete por substratos, co-fatores, ou requerimentos de energia dentro de uma via biossintética de ácido graxo. Em uma concretização particular, o gene atenuado contém pelo menos um de *fadE*, *gpsA*, *ldhA*, *pflB*, *adhE*, *pta*, *poxB*, *ackA*, *ackB*, *plsB*, e/ou *sfa*.

Em uma concretização da invenção, uma célula hospedeira recombinante contém um gene (ou um polinucleotídeo) codificando uma tioesterase mutante (ou uma equivalente desta que ocorre na natureza) e um gene exógeno introduzido de maneira heteróloga codificando pelo menos uma enzima de derivado de ácido graxo. Em

certas concretizações, o gene ou polinucleotídeo exógeno codifica, por exemplo, uma acil-CoA sintase, uma éster sintase, uma álcool acetiltransferase, uma álcool desidrogenase, uma acil-CoA redutase, uma acil-CoA redutase formadora de álcool graxo, uma redutase de ácido carboxílico, uma decarboxilase, uma aldeído redutase, uma acetiltransferase de álcool graxo, uma enzima condensadora de acil, uma aminotransferase, ou uma decarbonilase.

Em uma concretização da invenção, uma célula hospedeira recombinante contém um gene codificando uma tioesterase mutante (ou uma equivalente desta que ocorre na natureza) e pelo menos dois genes exógenos introduzidos de maneira heteróloga codificando enzimas de derivado de ácido graxo. Em certas concretizações, o gene ou polinucleotídeo exógeno codifica, por exemplo, uma acil-CoA sintase, uma éster sintase, uma álcool acetiltransferase, uma álcool desidrogenase, uma acil-CoA redutase, uma acil-CoA redutase formadora de álcool graxo, uma redutase de ácido carboxílico, uma decarboxilase, uma aldeído redutase, uma acetiltransferase de álcool graxo, uma enzima condensadora de acil, uma aminotransferase, ou uma decarbonilase.

Em uma concretização preferencial da invenção, um gene codificando uma tioesterase mutante (ou uma equivalente desta que ocorre na natureza) e/ou uma enzima de derivado de ácido graxo, por exemplo, uma acil-CoA sintase, uma éster sintase, uma álcool acetiltransferase, uma álcool desidrogenase, uma acil-CoA redutase, uma acil-CoA redutase formadora de álcool graxo, uma redutase de ácido carboxílico, uma decarboxilase, uma

aldeído redutase, uma acetiltransferase de álcool graxo, uma enzima condensadora de acil, uma aminotransferase, uma tioesterase adicional ou uma decarbonilase que é super-expressa.

Em uma concretização da invenção, genes codificando tioesterases mutantes (ou equivalentes destas que ocorrem na natureza), enzimas de derivado de ácido graxo e/ou outros genes expressos de maneira recombinante em uma célula hospedeira recombinante são modificados para aperfeiçoar pelo menos um códon para expressão na célula hospedeira recombinante.

Em uma concretização da invenção, a célula hospedeira recombinante contém pelo menos um gene codificando uma tioesterase mutante (ou uma equivalente desta que ocorre na natureza) e um gene codificando uma acil-CoA sintase. A acil-CoA sintase pode ser qualquer uma dentre *fadD, fadK, BH3103, yhfL, Pfl-4354, EAV15023, fadD1, fadD2, RPC_4074, fadDD35, fadDD22, faa3p,* ou o gene codificando a proteína ZP_01644857. Outros exemplos de genes de acil-CoA sintase incluem *fadDD35* de *M. tuberculosis HR7Rv* [NP_217021], *yhfL* de *B. subtilis* [NP_388908], *fadD1* de *P. aeruginosa PAO1* [NP_251989], o gene codificando a proteína ZP_01644857 de *Stenotrophomonas maltophilia R551-3*, ou *faa3p* de *Saccharomyces cerevisiae* [NP_012257].

Em uma concretização da invenção, uma célula hospedeira recombinante é provida contendo pelo menos um gene ou polinucleotídeo codificando uma tioesterase mutante (ou uma equivalente desta que ocorre na natureza) e um gene ou polinucleotídeo codificando uma éster sintase, tal com uma éster sintase obtida de *Acinetobacter spp., Alcanivorax borkumensis,*

Arabidopsis thaliana, *Saccharomyces cerevisiae*, *Homo sapiens*, *Simmondsia chinensis*, *Mortierella alpina*, *Cryptococcus curvatus*, *Alcanivorax jadensis*, *Alcanivorax borkumensis*, *Acinetobacter sp. HO1-N*, ou *Rhodococcus opacus*. Exemplos de genes de éster sintase incluem *wax/dgat*, codificando uma éster sintase/acil-CoA bifuncional: diacilglicerol aciltransferase de *Simmondsia chinensis*, *Acinetobacter sp.* cepa *ADP1*, *Alcanivorax borkumensis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Fundibacter jadensis*, *Arabidopsis thaliana*, ou *Alkaligenes eutrophus*. Em uma concretização preferencial, o gene codificando a éster sintase é super-expressa.

Em uma concretização da invenção, a célula hospedeira recombinante contém pelo menos um gene codificando uma enzima biossintética de aldeído graxo. Um gene biossintético de aldeído graxo pode ser, por exemplo, um gene redutase de ácido carboxílico (*ex.*, um gene *car*), apresentando uma sequência polinucleotídica e/ou motivo polipeptídico listados nas **FIGs. 32** e **33**, ou uma variante destes. Em alguns exemplos, um gene biossintético de aldeído graxo codifica um ou mais motivos de aminoácidos demostrado no **ANEXO 2.**

Em uma concretização da invenção, uma célula hospedeira recombinante contém um gene de produção de álcool graxo. Genes de produção de álcool graxo incluem, por exemplo, *acr1*. Genes de produção de álcool graxo são descritos em , por exemplo, PCT Publication Nos. 2008/119082 e 2007/136762, as revelações das quais estão incorporadas aqui por referência.

Em uma concretização da invenção, a célula hospedeira recombinante contém um gene codificando uma tioesterase mutante

(ou uma equivalente desta que ocorre na natureza) e um gene codificando pelo menos um gene produtor de olefina. O gene pode ser um gene produtor de olefina terminal ou um gene produtor de olefina interna. Como exemplos de genes produtores de olefina terminal, aqueles descritos em PCT Publication No. 2009/085278, incluindo o*rf880,* são apropriados. Como exemplos de genes produtores de olefina interna, aqueles descritos em PCT Publication No. 2008/147781 A2 são apropriados. As revelações de PCT Publication Nos. 2009/085278 e 2008/147781 A2 estão incorporadas aqui por referência.

Em uma concretização da invenção, uma célula hospedeira recombinante é provida contendo pelo menos um gene ou polinucleotídeo codificando uma tioesterase mutante (ou uma equivalente desta que ocorre na natureza), e pelo menos um de (a) um gene ou polinucleotídeo codificando uma enzima de derivado de ácido graxo e (b) um gene ou polinucleotídeo codificando uma enzima acil-CoA desidrogenase que é atenuada. Preferencialmente aquele gene codificando uma enzima derivado de ácido graxo que é atenuado ou deletado é endógeno à célula hospedeira, codificando, por exemplo, uma acil-CoA sintase, uma éster sintase, uma álcool acetiltransferase, uma álcool desidrogenase, uma acil-CoA redutase, uma redutase de ácido carboxílico, uma decarbonilase, uma acetiltransferase de álcool graxo, uma decarboxilase de ácido graxo, ou uma acil-CoA redutase formadora de álcool graxo. Em uma concretização, os genes atenuados codificam uma acil-CoA sintase ou uma éster sintase.

Em uma concretização da invenção, uma célula hospedeira recombinante é provida que expressa, ou preferencialmente super-

expressa, uma enzima tioesterase sob condições que resultam na síntese direta de ésteres graxos a partir de acil-ACP ou acil-CoA, tais como metil ésteres de ácido graxo (FAME) e etil ésteres de ácido graxo (FAEE), por tal tioesterase. Nessa concretização, a tioesterase converte diretamente acil-ACP ou acil-CoA em éster graxo sem necessariamente expressar uma enzima que é uma acil CoA graxo sintase ou uma éster sintase para produzir ésteres graxos. Todavia, enquanto a expressão ou super-expressão de uma acil CoA graxo sintase ou éster sintase é desnecessária, tais enzimas podem ser desejadas para aumentas a produtividade de produto. Nessa concretização, a enzima tioesterase pode ser qualquer uma dentre uma tioesterase endógena, uma tioesterase expressa de maneira heteróloga, uma tioesterase mutante, ou uma equivalente desta que ocorre na natureza.

Em uma concretização da invenção, a célula hospedeira recombinante apresenta um gene endógeno codificando uma enzima acil-CoA desidrogenase que é deletada ou atenuada.

Em uma concretização da invenção, um método é provido caracterizado pelo fato da célula hospedeira recombinante de acordo com a invenção ser cultivada sob condições que permitem a expressão ou super-expressão de uma ou mais enzimas tioesterases, que podem ser selecionadas dentre tioesterases endógenas, tioesterases expressas de maneira heteróloga, tioesterases mutantes (ou uma equivalente desta que ocorre na natureza), ou uma combinação dessas tioesterases. Em uma concretização particular, a enzima tioesterase que é expressa ou super-expressa pode ser recuperada, e mais preferencialmente substancialmente purificada, após a célula hospedeira ser

coletada e/ou lisada.

Em uma concretização da invenção, um método é provido caracterizado pelo fato da célula recombinante hospedeira de acordo com a invenção ser cultivada sob condições que permitem a produção de derivados de ácido graxo. Em uma concretização preferencial, o derivado de ácido graxo pode ser recuperado, e mais preferencialmente o derivado de ácido graxo é substancialmente purificado. Em uma concretização particularmente preferencial, a composição de derivado de ácido graxo é substancialmente purificada a partir de outros componentes produzidos durante o cultivo por centrifugação.

Em um aspecto da invenção, um método é provido para a produção de um derivado de ácido graxo, consistindo de cultivo da célula hospedeira recombinante da invenção sob condições apropriadas para garantir expressão ou super-expressão de uma tioesterase mutante (ou uma equivalente desta que ocorre na natureza), e recuperação do derivado de ácido graxo que é produzido.

Em uma concretização, um método é provido para produzir extracelularmente um derivado de ácido graxo *in vitro*, consistindo de cultivo de uma célula hospedeira recombinante sob condições apropriadas para expressão ou super-expressão de uma enzima tioesterase (incluindo, por exemplo, uma tioesterase endógena, uma tioesterase expressa de maneira heteróloga, uma tioesterase mutante, ou uma equivalente desta que ocorre na natureza), coleta das células, e lise das células, de modo que a enzima tioesterase que é produzida pode ser recuperada e utilizada para produzir derivados de ácido graxo *in vitro*. Em

uma concretização exemplar, a enzima tioesterase é substancialmente purificada. Em outra concretização exemplar, a enzima tioesterase não é purificada a partir do lisado celular. A enzima tioesterase purificada ou o lisado celular contendo tal enzima pode então ser submetida a substratos de tioesterase apropriados sob condições que permitem a produção de derivados de ácido graxo extracelularmente. Técnicas para apresentação de substratos a enzimas são bem conhecidas na arte. Um exemplo não limitante é a adição de substrato(s) em uma forma de solução à solução de enzima ou ao lisado celular, permitindo que a mistura fique incubada. Outro exemplo não limitante envolve a incubação de substrato(s) e solução de enzima ou lisada celular a um meio sólido (*ex.*, contas, resinas, placas, etc.) e passagem da solução de enzima/lisado ou substrato(s), respectivamente pelo meio sólido a uma velocidade que permita contato suficiente entre o(s) substrato(s) e a enzima.

Em outra concretização da invenção, um método é provido para a produção de um derivado de ácido graxo, que consiste do cultivo de uma célula hospedeira recombinante sob condições apropriadas para garantir a expressão de uma enzima tioesterase (incluindo, por exemplo, uma tioesterase endógena, uma tioesterase expressa de maneira heteróloga, uma tioesterase mutante, ou uma equivalente desta que ocorre na natureza), e recuperação do derivado de ácido graxo que é secretado ou liberado extracelularmente. De acordo, o produto de derivado de ácido graxo é recuperado a partir, por exemplo, do sobrenadante de um caldo de fermentação onde célula hospedeira é cultivada.

Em uma concretização da invenção, um método é provido para

obtenção extracelular de uma composição de derivado de ácido graxo através do cultivo de uma célula hospedeira recombinante que foi transformada com um polinucleotídeo codificando uma enzima tioesterase (incluindo, por exemplo, uma tioesterase endógena, uma tioesterase expressa de maneira heteróloga, uma tioesterase mutante, ou uma equivalente desta que ocorre na natureza), cultivo sob condições que permitem a produção de um derivado de ácido graxo, uma porção majoritária ou minoritária da qual é secretado ou liberado extracelularmente, e recuperação do derivado de ácido graxo que é produzido. Em uma concretização exemplar, o derivado de ácido graxo é produzido dentro da célula, porém uma porção dele é liberado pela célula hospedeira. De acordo, o método adicionalmente consiste de coleta das células, lise das células, e recuperação do derivado de ácido graxo.

Em uma concretização da invenção, um método de produção de derivados de ácido graxo é provido caracterizado pelo fato da célula hospedeira recombinante que expressa, ou preferencialmente super-expressa, uma enzima tioesterase sob condições que resultam na síntese de ésteres graxos a partir de acil-ACVP ou acil-CoA por tal tioesterase ser cultivada sob condições que permitem tal produção direta de ésteres graxos.

Em uma concretização da invenção, um método de produção de derivados de ácido graxo é provido consistindo de: modificar uma ou mais tioesterases endógenas da célula hospedeira utilizando técnicas apropriadas de alteração genômica de modo que as tioesterases endógenas contêm uma ou mais mutações e apresentam uma ou mais propriedades alteradas, quando comparadas aos precursores endógenos de tioesterase; e cultivo da célula

hospedeira sob condições apropriadas para a dita célula hospedeira expressar ou super-expressar tais tioesterases mutantes; e recuperação das derivados de ácido graxo. Em uma concretização exemplar, o derivado de ácido graxo que é produzido pode ser secretado ou liberado extracelularmente, de modo que ele possa ser recuperado, por exemplo, a partir do sobrenadante do caldo de fermentação onde a célula hospedeira é cultivada.

Em uma concretização da invenção, um método de produção de derivados de ácido graxo é provido consistindo de: transformar a célula hospedeira com uma sequência polinucleotídica codificando uma tioesterase mutante (ou uma equivalente desta que ocorre na natureza), de modo que a produção de derivados de ácido graxo na célula hospedeira é alterado em relação a uma célula que não foi transformada com o gene da tioesterase mutante (ou uma equivalente desta que ocorre na natureza).

Em uma concretização da invenção, um método de produção de derivados de ácido graxo é provido consistindo de: prover uma sequência polinucleotídica contendo o gene codificando uma tioesterase mutante (ou uma equivalente desta que ocorre na natureza); transformar uma célula hospedeira apropriada sob condições caracterizadas pelo fato da dita sequência polinucleotídica ser incorporada no dito cromossomo da dita célula e o dito gene passível de ser expresso dentro da dita célula hospedeira; cultivar a célula hospedeira transformada sob condições apropriadas para a dita célula hospedeira expressar o dito gene e produzir uma proteína tioesterase mutante (ou uma equivalente desta que ocorre na natureza); e recuperar os derivados de ácido graxo.

Em qualquer uma das concretizações acima, derivados de um certo comprimento de cadeia de carbono podem ser recuperados a uma produtividade proporcional maior, em comparação com a produção de tais derivados de ácido graxo de mesmo comprimento de cadeia de carbono na mesma célula hospedeira na ausência da tioesterase mutante (ou uma equivalente desta que ocorre na natureza). Em uma concretização particular, os derivados de ácido graxo que são recuperados a uma produtividade aumentada ou diminuída contém um comprimento de cadeia primária de cadeia acil graxo C_6, C_7, C_8, C_9, C_{10}, C_{11}, C_{12}, C_{13}, C_{14}, C_{15}, C_{16}, C_{17}, C_{18}, C_{19}, C_{20}, C_{21}, C_{22}, C_{23}, C_{24}, C_{25}, C_{26}, C_{28}, C_{29}, C_{30}, C_{31}, C_{32}, C_{33}, C_{34}, C_{35}, C_{36}, C_{37}, C_{38} ou C_{39}. Os derivados de ácido graxo que são recuperados a uma produtividade aumentada ou diminuída na composição podem ser selecionados dentre todos os tipos de derivados de ácido graxo, incluindo, por exemplo, hidrocarbonos, ácidos graxos, ésteres graxos, aldeídos graxos, olefinas terminais de alcoóis graxos, olefinas internas, alcanos, diols, aminas graxas, ácidos dicarboxílicos, ou cetonas, ou combinações destes.

Alternativamente, em qualquer uma das concretizações acima, um derivado de ácido graxo particular pode ser produzido a uma produtividade proporcional ou de porcentagem aumentada ou diminuída relativo aos outros derivados de ácido graxo, quando comparado à produtividade proporcional ou de porcentagem daquele derivado de ácido graxo particular na mesma célula hospedeira na ausência da tioesterase mutante (ou uma equivalente desta que ocorre na natureza). Em uma concretização particular, o derivado de ácido graxo que é produzido a uma produtividade proporcional ou de porcentagem aumentada é um éster graxo. Em outra

concretização, o derivado de ácido graxo que é produzido a uma produtividade proporcional ou de porcentagem diminuída é um éster graxo.

Alternativamente, em qualquer uma das concretizações acima, derivados de ácido graxo podem ser produzidos a uma produtividade aumentada, ou a uma produtividade proporcional aumentada de produtos de cadeia curta (*ex.*, C_8, C_9, C_{10}, C_{11}, C_{12}, C_{13}, ou C_{14}). Por outro lado, em qualquer uma das concretizações acima, derivados de ácido graxo podem ser produzidos a uma produtividade diminuída, ou a uma produtividade proporcional diminuída de produtos de cadeia curta (*ex.*, C_8, C_9, C_{10}, C_{11}, C_{12}, C_{13}, ou C_{14}).

Em uma concretização da invenção, um método de produção de derivados de ácido graxo é provido caracterizado pelo fato da produtividade de derivados de ácido graxo produzidos através do método da invenção ser de pelo menos por volta de 0,001 g de produto de derivado de ácido graxo/g de fonte de carbono, por exemplo, pelo menos por volta de 0,01 g de produto de derivado de ácido graxo/g de fonte de carbono, por volta de 0,1 g de produto de derivado de ácido graxo/g de fonte de carbono, por volta de 0,1 g de produto de derivado de ácido graxo/g de fonte de carbono, por volta de 0,2 g de produto de derivado de ácido graxo/g de fonte de carbono, por volta de 0,3 g de produto de derivado de ácido graxo/g de fonte de carbono, por volta de 0,4 g de produto de derivado de ácido graxo/g de fonte de carbono, por volta de 0,45 g de produto de derivado de ácido graxo/g de fonte de carbono.

Em uma concretização da invenção, um método de produção de derivados de ácido graxo é provido caracterizado pelo fato do

método resultar em uma titulação de pelo menos por volta de 0,5 g/L, por exemplo, pelo menos por volta de 1 g/L, 2 g/L, 5 g/L, 10 g/L, 20 g/L, 30 g/L, 40 g/L, 50 g/L, 75 g/L, 100 g/L, 150 g/L ou 200 g/L.

Em uma concretização da invenção, um método de produção de derivados de ácido graxo é provido caracterizado pelo fato da produtividade do método ser tal de modo que pelo menos por volta de 0,1 g/L.h, por exemplo, pelo menos por volta de 0,5 g/L.h, 1 g/L.h, 2 g/L.h, 3 g/L.h, 4 g/L.h, 5 g/L.h, 6 g/L.h, 7 g/L.h ou 8 g/L.h é produzido.

Em uma concretização da invenção, composições de derivados de ácidos graxos são providas pela célula hospedeira da invenção. Tais composições podem conter hidrocarbonos, ésteres, alcoóis, cetonas, aldeídos, ácidos graxos, ácidos dicarboxílicos, olefinas internas, olefinas terminais, e/ou combinações destes. Tais composições são úteis em aplicações na indústria química, por exemplo, na produção de surfactantes e detergentes, ou como um biocombustível e um substituto para petróleo, óleo combustível, querosene, diesel, combustível de aviação ou gasolina.

Em uma concretização da invenção, composições de derivado de ácido graxo são providas contendo menos que ou igual a por volta de 50 ppm arsênico, por volta de 30 ppm, por volta de 25 ppm, ou entre por volta de 10 e por volta de 50 ppm arsênico; menos que ou igual a por volta de 200 ppm cálcio, por volta de 150 ppm cálcio, por volta de 119 ppm cálcio ou entre por volta de 50 e por volta de 200 ppm cálcio; menos que ou igual a por volta de 200 ppm cloro, por volta de 150 ppm cloro, por volta de

119 ppm cloro ou entre por volta de 50 e por volta de 200 ppm cloro; menos que ou igual a por volta de 50 ppm cobre, por volta de 30 ppm cobre, por volta de 23 ppm cobre, ou entre por volta de 10 e por volta de 50 ppm cobre; menos que ou igual a por volta de 300 ppm ferro, por volta de 200 ppm ferro, por volta de 136 ppm ferro, ou entre por volta de 50 e por volta de 250 ppm ferro; menos que ou igual a por volta de 50 ppm chumbo, por volta de 30 ppm chumbo, por volta de 25 ppm chumbo, ou entre por volta de 10 e por volta de 50 ppm chumbo; menos que ou igual a por volta de 50 ppm manganês, por volta de 30 ppm manganês, por volta de 23 ppm manganês, ou entre por volta de 10 e por volta de 50 ppm manganês; menos que ou igual a por volta de 50 ppm magnésio, por volta de 30 ppm magnésio, por volta de 23 ppm magnésio, ou entre por volta de 10 e por volta de 50 ppm magnésio; menos que ou igual a por volta de 0,5 ppm mercúrio, por volta de 0,1 ppm mercúrio, por volta de 0,06 ppm mercúrio ou entre por volta de 0,01 e por volta de 0,2 ppm mercúrio; menos que ou igual a por volta de 50 ppm molibdênio, por volta de 30 ppm molibdênio, por volta de 23 ppm molibdênio ou entre por volta de 10 e por volta de 50 ppm molibdênio; menos que ou igual a por volta de 2% nitrogênio; por volta de 1% nitrogênio, por volta de 0,5% nitrogênio, ou entre por volta de 0,1-1% nitrogênio; menos que ou igual a por volta de 200 ppm potássio, por volta de 150 ppm potássio, por volta de 103 ppm potássio, ou entre por volta de 50 e por volta de 200 ppm potássio; menos que ou igual a por volta de 300 ppm sódio, 200 ppm sódio, por volta de 140 ppm sódio, ou entre por volta de 50 e por volta de 300 ppm sódio; menos que ou igual a por volta de 1 ppm enxofre, menos que ou igual a por volta de 1% enxofre, por volta de 0,14% enxofre, ou

entre por volta de 0,05 e por volta de 0,3% enxofre; menos que ou igual a por volta de 50 ppm zinco, por volta de 30 ppm zinco, por volta de 23 ppm zinco, ou entre por volta de 10 e por volta de 50 ppm zinco; ou menos que ou igual a por volta de 700 ppm fósforo, por volta de 500 ppm fósforo, por volta de 350 ppm fósforo, ou entre por volta de 100 e por volta de 700 ppm fósforo.

Em uma concretização da invenção, derivados de ácido graxo apresentando frações de carbono moderno de por volta de 1,003 a por volta de 1,5 são providos.

Em uma concretização da invenção, uma composição de derivado de ácido graxo é provida caracterizada pelo fato da composição incluir constituintes contendo um grupo acil que apresenta uma ligação dupla na posição 7 na cadeia de carbono (entre o carbono número 7 na cadeia de carbono e o carbono número 8 na cadeia de carbono) a partir de sua extremidade reduzida.

Em uma concretização particular, uma composição de derivado de ácido graxo contém ésteres graxos C_5-C_{25} (*i.e.*, uma cadeia de carbono de 5 a 25 carbonos de comprimento), ácidos graxos C_5-C_{25}, aldeídos graxos C_5-C_{25}, alcoóis graxos C_5-C_{25}; ou ésteres graxos C_{10}-C_{20} (*i.e.*, uma cadeia de carbono de 10 a 20 carbonos de comprimento), ácidos graxos C_{10}-C_{20}, aldeídos graxos C_{10}-C_{20}, alcoóis graxos C_{10}-C_{20}; ou ésteres graxos C_{12}-C_{18} (*i.e.*, uma cadeia de carbono de 12 a 18 carbonos de comprimento), ácidos graxos C_{12}-C_{18}, aldeídos graxos C_{12}-C_{18}, alcoóis graxos C_{12}-C_{18}.

Em uma concretização particular, os derivados de ácido graxo da invenção consistem de derivados de ácido graxo de cadeia simples, derivados de ácido graxo de cadeia ramificada, e/ou

porções cíclicas. Em uma concretização particular, os derivados de ácidos graxo são insaturados (*ex.*, monoinsaturados) ou saturados.

Em uma concretização da invenção, a composição de derivado de ácido graxo contém um éster graxo que é produzido a partir de um álcool e um acil-CoA, caracterizado pelo fato do álcool ser pelo menos por volta de 1, por exemplo, pelo menos por volta de 2, por volta de 3, por volta de 4, por volta de 5, por volta de 6, por volta de 7, por volta de 8, por volta de 10, por volta de 12, por volta de 14, por volta de 16, ou por volta de 18 carbonos de comprimento, e a acil-CoA é pelo menos por volta de 2, por exemplo, pelo menos por volta de 4, por volta de 6, por volta de 8, por volta de 10, por volta de 12, por volta de 14, por volta de 16, por volta de 18, por volta de 20, por volta de 22, por volta de 24, ou por volta de 26 carbonos de comprimento. Em algumas concretizações, o álcool e acil-CoA dos quais o éster graxo é produzido varia em por volta de 2, por volta de 4, por volta de 6, por volta de 8, por volta de 10, por volta de 12, ou por volta de 14 átomos de carbono.

Em uma concretização da invenção, a composição de derivado de ácido graxo contém um éster graxo que é produzido a partir de um álcool e um acil-ACP, caracterizado pelo fato do álcool ser pelo menos por volta de 1, por exemplo, pelo menos por volta de 2, por volta de 3, por volta de 4, por volta de 5, por volta de 6, por volta de 7, por volta de 8, por volta de 10, por volta de 12, por volta de 14, por volta de 16, ou por volta de 18 carbonos de comprimento, e a acil-ACP ser pelo menos por volta de 2, por exemplo, por volta de 4, por volta de 6, por volta de 8, por

volta de 10, por volta de 12, por volta de 14, por volta de 16, por volta de 18, por volta de 20, por volta de 22, por volta de 24, ou por volta de 26 carbonos de comprimento. Em algumas concretizações, o álcool e acil-ACP dos quais o éster graxo é produzido varia em por volta de 2, por volta de 4, por volta de 6, por volta de 8, por volta de 10, por volta de 12 ou por volta de 14 átomos de carbono.

Em uma concretização da invenção, a composição de derivado de ácido graxo consiste de uma mistura de derivados incluindo ácidos graxos livres. Em uma concretização, a porcentagem de ácidos graxos livres por peso é de pelo menos por volta de 0,5%, por exemplo, pelo menos por volta de 1%, por volta de 2%, por volta de 3%, por volta de 4%, por volta de 5%, por volta de 6%, por volta de 7%, por volta de 8%, por volta de 9%, por volta de 10%, por volta de 15%, por volta de 20%, ou por volta de 25%. Em uma certa concretização, a porcentagem de ésteres graxos produzido por peso é de pelo menos por volta de 50%, por exemplo, pelo menos por volta de 55%, por volta de 60%, por volta de 65%, por volta de 70%, por volta de 75%, por volta de 80%, por volta de 85%, ou por volta de 90%. Em uma concretização adicional, a proporção de derivados de ácido graxo exceto ácidos graxos livres para ácidos graxos livres é maior que por volta de 90:1, por exemplo, maior que por volta de 80:1, por volta de 50:1, por volta de 20:1, por volta de 10:1, por volta de 9:1, por volta de 8:1, por volta de 7:1, por volta de 5:1, por volta de 2:1 ou por volta de 1:1, por peso.

Em uma concretização, a composição de derivado de ácido graxo consiste de uma mistura de derivados incluindo ácidos

graxos livres. Em uma concretização, a porcentagem de ácidos graxos livres por peso é de pelo menos por volta de 50%, por exemplo, pelo menos por volta de 55%, por volta de 60%, por volta de 65%, por volta de 70%, por volta de 75%, por volta de 80%, por volta de 85%, ou por volta de 90%. Em uma certa concretização, a porcentagem de ésteres graxos produzido por peso é de pelo menos por volta de pelo menos por volta de 0.5%, por exemplo, pelo menos por volta de 1%, por volta de 2%, por volta de 3%, por volta de 4%, por volta de 5%, por volta de 6%, por volta de 7%, por volta de 8%, por volta de 9%, por volta de 10%, por volta de 15%, por volta de 20%, por volta de 25%, por volta de 30%, por volta de 35%, por volta de 40%, por volta de 45%, ou por volta de 50%. Em uma concretização adicional, a proporção de derivados de ácido graxo exceto ácidos graxos livres para ácidos graxos livres é menor que por volta de 60:1, por exemplo, menor que por volta de 50:1, por volta de 40:1, por volta de 30:1, por volta de 20:1, por volta de 10:1, por volta de 1:1, por volta de 1:2; por volta de 1:3, por volta de 1:5, ou por volta de 1:10, por peso.

Em uma concretização da invenção, a composição de derivado de ácido graxo inclui um ou mais ésteres graxos selecionados dentre: etil decanoato, etil dodecanoato, etil tridecanoato, etil tetradecanoato, etil pentadecanoato, etil *cis*-9-hexadecenoato, etil hexadecanoato, etil heptadecanoato, etil *cis*-11-octadecenoato, etil octadecanoato, metil decanoato, metil dodecanoato, metil tridecanoato, metil tetradecanoato, metil pentadecanoato, metil *cis*-9-hexadecenoato, metil hexadecanoato, metil heptadecanoato, metil *cis*-11-octadecenoato, metil octadecanoato, ou uma combinação destes.

Em uma concretização da invenção, a composição de derivado de ácido graxo inclui um ou mais ácidos graxos livres selecionados dentre: ácido octanóico, ácido decanóico, ácido dodecanóico, ácido tetradecanóico, ácido pentanóico, ácidos *cis*-9-hexadecenóico, ácido *cis*-11-octadecenóico, ou combinações destes.

Composições contendo os derivados de ácido graxo da invenção podem ser utilizadas como combustíveis. Por exemplo, os derivados de ácido graxo podem ser utilizados como, ou como um componente de, um biodiesel, um álcool graxo, um éster graxo, um triacilglicerídeo, uma gasolina, um diesel, ou um combustível de aviação. Uma composição de gasolina ou biodiesel pode ser utilizada em um motor de combustão interna. Um combustível de aviação pode ser utilizado em um motor de avião. De acordo, composições de combustível contendo derivados de ácido graxo preparados de acordo com a presente invenção são providos aqui.

Composições contendo derivados de ácido graxo da invenção podem ser utilizadas como aditivos de combustíveis. Por exemplo, elas podem ser adicionadas a um diesel ou biodiesel baseado em petróleo para melhorar seu conteúdo de combustível renovável, lubricidade, viscosidade cinemática, número de ácido, ponto de ebulição, estabilidade oxidativa, ponto de entupimento de filtro a frio, perfis de impureza, nível de cinza sulfatada, número de cetano, ponto de turvação, ou ponto de vazamento. De acordo, composições de aditivo de combustível contendo derivados de ácido graxo produzidos de acordo com as presentes revelações são também providas.

Composições contendo derivados de ácido graxo da invenção

podem também ser utilizadas como composições de "biocrude", que podem servir como matéria-prima para a produção de outros compostos derivados do petróleo. Por exemplo, hidrocarbonos de cadeia longa, olefinas internas ou terminais, alcanos, aldeídos graxos e ésteres graxos obtidos de acordo com a presente invenção podem ser adicionalmente processados para produzir combustíveis, aditivos de combustíveis, mistura de combustíveis e/ou produtos químicos. De acordo, composições de "biocrude" contendo derivados de ácido graxo preparados de acordo com as presente revelações são providas.

Composições contendo derivados de ácido graxo da invenção podem ser utilizadas como matéria-prima na produção de detergentes e surfactantes, suplementos nutricionais, polímeros, substituintes de parafina, lubrificantes, solventes, produtos de higiene pessoal, aditivos de processamento de borracha, inibidores de corrosão, emulsificantes, plásticos, tecidos têxteis, cosméticos, produtos de papel, coberturas, fluidos para produtos metálicos, dielétricos, agentes de lubrificação, e/ou emolientes. De acordo, composições de matéria-prima preparadas de acordo com as presente revelações são também providas.

DESCRIÇÃO DE ANEXOS, FIGURAS E PRINCIPAIS SEQUENCIAS

O anexo 1 é uma tabela identificando vários genes que podem ser super-expressos ou atenuados para aumentar a produção de derivados de ácido graxo. A tabela também identifica vários genes que podem ser modulados para alterar a estrutura do produto de derivado de ácido graxo. Certos genes que são utilizados para alterar a estrutura do derivado de ácido graxo irão também aumentar a produção de derivados de ácido graxo.

O anexo 2 é uma listagem dos motivos de sequência de aminoácidos para homólogos CAR.

O anexo 3 descreve motivos de aminoácidos para identificação de tioesterases precursoras úteis na presente invenção.

Os anexos 4 e 5 incluem uma tabela listando os resultados de ensaios identificando tioesterases mutantes com propriedades alteradas. Em particular, **anexo 4** inclui listas de mutantes com pontuações Z de pelo menos 3 por atividade (*i.e.*, taxa catalítica) no que diz respeito ao substrato nomeado ou especificidade do substrato nomeado; e **anexo 5** é uma tabela de mutantes apresentando produtividade/produção melhorada e/ou aumentada de derivados de ácido graxo com pontuações Z de pelo menos 3.

Os anexos 6-10 incluem tabelas listando os resultados de ensaios identificando tioesterases mutante com produtividade proporcional alterada de ésteres graxos X outros produtos (*ex.*, derivados de ácido graxo com exceção de ésteres graxos). Em particular, **anexo 6** é uma tabela mostrando mutantes que apresentam pontuações Z de pelo menos 3 no que diz respeito a produtividade proporcional ou de porcentagem de ésteres graxos X ácidos graxos livres. **Anexo 7** é uma tabela mostrando mutantes que apresentam pontuações Z menores que -3 no que diz respeito à produtividade proporcional ou de porcentagem de ésteres graxos X ácidos graxos livres. **Anexo 8** é uma tabela mostrando mutantes que apresentam pontuações Z de pelo menos 3 no que diz respeito à produtividade *in vivo* de derivados de ácido graxo. **Anexo 9** é uma tabela mostrando mutantes que apresentam pontuações Z de pelo menos 3 no que diz respeito à produtividade proporcional de

derivados de ácido graxo de cadeia curta (*ex.*, C_8, C_9, C_{10}, C_{11}, C_{12}, C_{13}, e/ou C_{14}) X outros derivados de ácido graxo (*ex.*, derivados de ácido graxo com exceção de derivados de ácido graxo de cadeia curta incluindo, por exemplo, derivados de ácido graxo de cadeia longa (*ex.*, C_{15}, C_{16}, C_{17}, C_{18}, C_{19}, e/ou C_{20})). **Anexo 10** é uma tabela mostrando mutantes que apresentam pontuações Z menores que -3 no que diz respeito à produtividade proporcional de derivados de ácido graxo de cadeia curta (*ex.*, C_8, C_9, C_{10}, C_{11}, C_{12}, C_{13}, e/ou C_{14}) X outros derivados de ácido graxo (*ex.*, derivados de ácido graxo com exceção de derivados de ácido graxo de cadeia curta incluindo, por exemplo, derivados de ácido graxo de cadeia longa (*ex.*, C_{15}, C_{16}, C_{17}, C_{18}, C_{19}, e/ou C_{20})).

O anexo 11 é um alinhamento de sequência de homólogos de 'TesA utilizando os resíduos de aminoácido de uma 'TesA de *E.coli* (*i.e.*, TesA sem o peptídeo sinal) como uma sequência de referência para propósitos de numeração.

Anexo 12 compara as regiões de sequência relevantes de tioesterases que ocorrem na natureza que contêm resíduos nas posições que correspondem a mutações em 'TesA que introduzem propriedades alteradas. O resíduo relevante é marcado em cor escura, e alinhado com resíduos correspondentes em tioesterases que ocorrem naturalmente.

O anexo 13 lista Números de Acesso do GenBank de homólogos de 'TesA.

Figura 1 (FIG. 1) é um diagrama ilustrando a via de beta-

oxidação, incluindo as etapas catalisadas pelas seguintes enzimas (1) acil-CoA sintase (EC 6.2.1.-). (2) acil-CoA desidrogenase (EC 1.3.99.3), (3) enoil-CoA hidratase (EC 4.2.1.17); (4) 3-hidroxibutiril-CoA epimerase (EC 5.1.2.3), e (5) 3-cetoacil-CoA tiolase (EC 2.3.1.16). Essa reação final do ciclo de β-oxidação, libera ácido graxo acetil-CoA e acil-CoA com menos dois carbonos, prontos para passar pelas reações de β-oxidação novamente.

Figura 2 (FIG. 2) é um diagrama ilustrando a via biossintética FAS.

Figura 3 (FIG. 3) é um diagrama ilustrando vias biossintéticas que produzem ésteres graxos dependendo dos substratos providos.

Figura 4 (FIG. 4) é um diagrama ilustrando vias biossintéticas que produzem alcoóis graxos.

Figura 5 (FIG. 5) é um gráfico representando a produção de álcool graxo pela cepa co-transformada com pCDFDuet-1-*fadD-acr1* e plasmídeos contendo vários genes tioesterase. Alcoóis graxos C_{10}, C_{12}, C_{14}, C_{16} e C_{18} saturados foram identificados.

Figura 6 (FIG. 6) é um gráfico representando a produção de álcool graxo pela cepa descrita no Exemplo 3, co-transformada com pCDFDuet-1-*fadD-acr1* e plasmídeos contendo vários genes tioesterase. As cepas foram crescidas de maneira aeróbica a 25°C ou 37°C em um meio mineral M9 contendo 0,4% de glicose em frascos de agitação. Alcoóis graxos foram detectados nos precipitados celulares assim como nos sobrenadantes, indicando uma produção

extracelular substancial de tais alcoóis. Cultivo a 25°C resultou na liberação de por volta de 25% do produção pelas células, enquanto o cultivo a 37°C resultou na liberação de por volta de 50% do produto pelas células.

Figura 7A-D (Figs. 7A-D) são plotagens representando espectros GC-MS de octanoato de octila (C_8C_8) produzido através de uma hospedeira de produção expressando uma álcool acetiltransferase (AATs, EC 2.3.1.84) e hospedeiros de produção expressando éster sintase (EC 2.3.1.20, 2.3.1.75). **FIG. 7A** é um espectro GC-MS apresentando extrato de acetato de etila de cepa C41(DE3, Δ*fadE*/pHZ1.43) /pRSET B+pAS004.114B) caracterizado pelo fato do plasmídeo pHZ1.43 expressar ADP1 éster sintase (EC 2.3.1.20, 2.3.1.75). **FIG. 7B** é um espectro GC-MS apresentando extrato de acetato de etila de cepa C41(DE3, Δ*fadE*/pHZ1.43)/pRSET B+pAS004.114B) caracterizado pelo fato do plasmídeo pHZ1.43 expressando SAAT. **FIG. 7C** é um espectro GC-MS apresentando extrato de acetato de etila de cepa C41(DE3, Δ*fadE*/pHZ1.43)/pRSET B+pAS004.114B) caracterizado pelo fato do plasmídeo pHZ1.43 não conter ADP1 (uma éster sintase) ou SAAT. **FIG. 7D** é um espectro GC-MS apresentando o espectro de massa e padrão de fragmentação de C_8C_8 produzido por C41(DE3, Δ*fadE*/pHZ1.43) /pRSET B+pAS004.114B caracterizado pelo fato do plasmídeo pHZ1.43 expressar SAAT).

Figura 8 (FIG. 8) é um gráfico representando a distribuição de etil ésteres feita (de acordo com Exemplo 9) quando a éster sintase de *A. baylyi* ADP1 (WSadp1) foi co-expressa com uma tioesterase de *Cuphea hookeriana* em uma hospedeira de produção.

Figura 9 (FIG. 9) é um gráfico representando a produção de

etil ésteres por várias éster sintases a 25°C. Os etil ésteres foram produzidos por cepas recombinantes de *E. coli* carregando vários genes éster sintase. As cepas recombinantes foram (1) C41 (DE3, Δ*fadE*Δ*fabR*)/pETDuet-1-'TesA + pCDFDuet-1-*fadD* com 1 pHZ1.43; (2) pHZ1.97_377; (3) pHZ1.97_atfA2; (4) pHZ1.97_376; (5) pHZ1.97_atfA1; e (6) sem plasmídeo (controle).

Figura 10 (FIG. 10) é um gráfico representando a composição acil de etil ésteres de ácidos graxos (FAEE) produzidos a partir de várias cepas de *E. coli*. As cepas recombinantes são (1) C41 (DE3, Δ*fadE*ΔfabR)/ pETDuet-1-'TesA + pCDFDuet-1-*fadD* com 1 pHZ1.43; (2) pHZ1.97_377; (3) pHZ1.97_atfA2; (4) pHZ1.97_376; (5) pHZ1.97_atfA1; e (6) sem plasmídeo (controle).

Figura 11 (FIG. 11) é um gráfico representando a produção de etil éteres por várias éster sintases a 37°C. Os etil ésteres foram produzidos por cepas recombinantes de *E. coli* carregando vários genes éster sintase. As cepas recombinantes foram (1) C41 (DE3, Δ*fadE*Δ*fabR*)/ pETDuet-1-'TesA + pCDFDuet-1-*fadD* com 1 pHZ1.43; (2) pHZ1.97_377; (3) pHZ1.97_atfA2; (4) pHZ1.97_376; (5) pHZ1.97_atfA1; e (6) sem plasmídeo (controle).

Figura 12 (FIG. 12) é um gráfico representando concentrações de ácidos graxos livres (FFA) e etil ésteres de ácidos graxos (FAEE) produzidos a partir de três colônias individuais dentre as transformantes, C41 (DE3, Δ*fadE*Δ*fabR*)/ pETDuet-1-'TesA + pCDFDuet-1-*fadD* +pHZ1.97_*atfA2*. O FFA foi convertido em etil éster de ácido graxo (FAEE) e quantificado por GC/MS.

Figura 13 (FIG. 13) é um diagrama representando as regiões controle para FabA (SEQ ID NO:33) e FabB (SEQ ID NO:34). Os

sítios consenso de ligação de FadR e FabR são mostrados em negrito. Setas verticais indicam as posições onde mutações podem ser feitas para alterar a expressão de *fabA*. A base proposta para cada posição é também indicada pelos colchetes. As duas regiões que constituem as regiões -35 e -10 do promotor típico de *E. coli* são indicadas pelos colchetes. As mutações propostas que tornam o promotor mais próximo da sequência promotora consenso também são mostradas.

Figuras 14A-B (Figs. 14A-B) são cromatogramas representando análise GC/MS. **FIG. 14A** é um cromatograma representando os componentes de um extrato de acetato de etila da cultura da cepa LS9001 de *E. coli* transformada com plasmídeos pCDFDuet-1-*fadD*-WSadp1, pETDuet-1-'TesA. **FIG. 14B** é um cromatograma representando a etil hexadecanoato e a etil oleato, que foram utilizadas como referências.

Figura 15 (FIG. 15) é um mapa do plasmídeo pOP-80.

Figura 16 (FIG. 16) é um esquema de uma nova via para produção de aldeído graxo.

Figuras 17A-B (Figs. 17A-B) são traços GC/MS de olefina produzido por células de *Jeotgalicoccus sp.ATCC 8456* e células de *Jeotgalicoccus halotolerans DSMZ 17274*, respectivamente.

Figuras 18A-B (Figs. 18A-B) são traços GC/MS de olefinas produzidas por células de *Jeotgalicoccus pinnipedalis DSMZ 17030* e células de *Jeotgalicoccus psychrophilus DSMZ 19085*, respectivamente.

Figuras 19A-B (Figs. 19A-B) são padrões de fragmentação de

espectrometria de massa de duas α-olefinas produzidas por células de *Jeotgalicoccus ATCC 8456*. O composto A foi identificado como 1-nonadeceno e o composto B como 18-metil-1-nonadeceno.

Figura 20 (FIG. 20) é um esquema de uma análise filogenética de rRNA 16s de *Jeotgalicoccus ATCC 8456*.

Figuras 21A-B (Figs. 21A-B) são traços GC/MS de α-olefinas produzidas por células de *Jeotgalicoccus sp. ATCC 8456* mediante alimentação com ácido eicosanóico (**FIG. 21A**) ou ácido esteárico (**FIG. 21B**).

Figura 22 (FIG. 22) é um traço GC/MS de α-olefinas (1-heptadeceno) produzidas por lisados livres de células de *Jeotgalicoccus sp. ATCC 8456*, quando comparado com um traço de lisado livre de células sem o substrato de ácido graxo C_{18}, e um traço do próprio substrato de ácido graxo C_{18}.

Figura 23 (FIG. 23) é uma representação digital de um gel de SDS-PAGE de fração final purificada de proteína produtora de α-olefinas a partir de células de *Jeotgalicoccus sp. ATCC 8456*.

Figura 24 (FIG. 24) é um traço GC/MS de α-olefinas produzidas por *E. coli* mediante expressão de *Jeotgalicoccus sp. 8456_orf880* e alimentação de ácido esteárico.

Figura 25 (FIG. 25) é um esquema de uma análise filogenética de "bootstrap" dos homólogos de *8456_orf880* utilizando ClustalW.

Figura 26 (FIG. 26) é um gráfico representando as titulações

de FAME e composição para a cepa MG1655 (*ΔfadE*) pTrc-'TesA_*fadD*.

Figura 27 (FIG. 27) é um gráfico representando as titulações de FAME e composição para as cepas MG1655 (*ΔfadE*) e C41(*ΔfadE*) expressando *fadD* e *'tesA* em plasmídeos durante uma corrida de fermentação de 25 horas.

Figura 28 (FIG. 28) é um gráfico representando as titulações de FAME e composição para a cepa MG1655 (*ΔfadE*) pTrc-'TesA_*fadD*.

Figura 29 (FIG. 29) é um gráfico representando as titulações de FAME e composição para as cepas MG1655 (*ΔfadE*) e C41 (*ΔfadE*) expressando *fadD* e *'tesA* em plasmídeos durante uma corrida de fermentação de 25 horas.

Figura 30 (**FIG. 30)** é um gráfico representando as titulações de FFA e composição para as cepas MG1655 (*ΔfadE*) e C41 (*ΔfadE*) expressando *fadD* e *'tesA* em plasmídeos durante uma corrida de fermentação de 25 horas.

Figura 31 (FIG. 31) é um gráfico representando as titulações de FAME para as cepas de MG1655 (Δ*fadE*) expressando *'tesA* de *E. coli*, *'tesA* de *P. luminescens*, *'tesA* de *V. harveyi* e *tesB* de *P. profundum* em plasmídeos, durante uma corrida de fermentação de 24 horas. Titulações são representadas em mg/L e mg/L/OD.

Figura 32 (FIG. 32) é um gráfico representando as titulações de FFA para as cepas de MG1655 (Δ*fadE*) expressando *'tesA* de *E. coli*, *'tesA* de *P. luminescens*, *'tesA* de *V. harveyi* e *tesB* de *P. profundum* em plasmídeos, durante uma corrida de fermentação de 24 horas. Titulações são representadas em mg/L (barras) e mg/L/OD (triângulos).

Figuras 33A-C (FIG. 33A-C) são gráficos representando especificidade de substrato (pontuação Z) X posições de resíduo de aminoácido correspondendo a sequência 'TesA de SEQ ID NO:31 com símbolos para representar níveis de conservação no alinhamento de cons70 para especificidade de C_{10} (**FIG. 33A**), especificidade de C_{12} (**FIG. 33B**) e especificidade de C_{14} (**FIG. 33C**).

Figura 34 (FIG. 34) é um gráfico de titulações de ácido graxo livre (FFA) e acil metil éster graxo (FAME) em culturas de células de *E. coli* MG1655 Δ*fadE* transformadas com pACYC contendo os homólogos de '*tesA* de *E. coli* (EcolA), *Pectobacterium atrosepticum* (PatrA), *Pseudomonas putida* (PputA), *Vibrio harveyi* (VharA), *Photorhabdus luminescens* (PlumA), ou com pACYC não contendo inserto (Neg).

Figura 35 (FIG. 35) é um gráfico de titulações de FFA a FAME em culturas de células de *E. coli* MG1655 Δ*fadE* super-expressando *fadD* e '*tesA* de *E. coli* (Ecoli), *Pectobacterium atrosepticum* (Patr), *Photorhabdus luminescens* (Plum), *Photobacterium profundum* (Ppro), *Vibrio harveyi* (VhA), *Pseudomonas putida* (Pput), ou sem '*tesA* (Neg). (Dado marcado com um asterisco (*) são de um experimento em separado.)

Figura 36 (FIG. 36) é um gráfico de titulações de FFA e FAME em culturas de *E. coli* MG1655 Δ*fadE* expressando a '*tesA* selvagem de *E. coli* (WT), o mutante S10C (S10C), ou sem '*tesA* (Neg).

Figura 37 (FIG. 37) é um gráfico de produção de FAME contra o tempo de uma corrida de fermentação com células hospedeiras

recombinantes que expressam tioesterase na ausência de éster sintase exógena.

Figura 38 (FIG. 38) é um gráfico de produção de FFA contra o tempo de uma corrida de fermentação com células hospedeiras recombinantes que expressam tioesterase na ausência de éster sintase exógena.

SEQ ID NO:1é a sequência de DNA completa do plasmídeo pOP-80.

SEQ ID NO:2é a sequência de DNA para o gene *fadD35* com códon otimizado de *E. coli* (Número de Acesso do GenBank NP_217021).

SEQ ID NO:3 é a sequência de DNA para o gene *fadD1* com códon otimizado de *E. coli* (Número de Acesso do GenBank NP_251989).

SEQ ID NO:4 é o oligo BsyhfLBspHIF baseado na sequência de DNA depositada no NCBI com Número de Acesso do GenBank NC_000964.

SEQ ID NO:5 é o oligo BsyhfLEcoR baseado na sequência de DNA depositada no NCBI com Número de Acesso do GenBank NC_000964.

SEQ ID NO:6 é a sequência de DNA para o gene *yhfL* de *Bacillus subtilis*.

SEQ ID NO:7 é o oligo Scfaa3pPciF baseado na sequência de DNA depositada no NCBI com Número de Acesso do GenBank NC_001141.

SEQ ID NO:8 é o oligo Scfaa3pPciI baseado na sequência de DNA depositada no NCBI com Número de Acesso do GenBank NC_001141.

SEQ ID NO:9 é a sequência de DNA para o gene *faa3* de *Saccharomyces cerevisiae* (Número de Acesso do GenBank NP_012257).

SEQ ID NO:10 é o oligo Smprk59BspF baseado na sequência de DNA depositada no NCBI com Número de Acesso do GenBank NZ_AAVZ01000044.

SEQ ID NO:11 é o oligo Smprk59HindR baseado na sequência de DNA depositada no NCBI com Número de Acesso do GenBank NZ_AAVZ01000044.

SEQ ID NO:12 é o oligo PrkBsp.

SEQ ID NO:13 é a sequência de DNA codificando a proteína ZP_01644857 de *Stenotrophomonas maltophilia R551-3* .

SEQ ID NO:14 é a sequência de proteína de ZP_01644857 de *Stenotrophomonas maltophilia ATCC 17679* .

SEQ ID NO:15 é uma listagem da sequência nucleotídica e SEQ ID NO:16 a sequência de aminoácido correspondente do gene *car* de *Nocardia sp. NRRL 5646*.

SEQ ID NO:25 e SEQ ID NO:26 são sequências de nucleotídeo e aminoácido de *orf880*, respectivamente. SEQ ID NO:27 é a sequência parcial do rRNA 16s de *Jeotgalicoccus sp.*ATCC8456.

SEQ ID NO:31 mostra sequência de aminoácido de uma 'TesA de *E. coli*.

SEQ ID NO:32 mostra uma sequência nucleotídica codificando uma 'TesA de *E.coli*.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Salvo quando definido o contrário, todos os termos técnicos e científicos utilizados aqui apresentam o mesmo significado que o comumente entendido por alguém de habilidade básica na arte a qual essa invenção pertence. Apesar de métodos e materiais similares ou equivalentes àqueles descritos aqui poderem ser utilizados na prática ou testagem da presente invenção, métodos e materiais apropriados são descritos abaixo. Todas as publicações, pedidos de patentes, patentes, e outras referências mencionadas aqui, incluindo sequências de banco de dados do GenBank, são incorporadas por referência na sua íntegra. Em caso de conflito, a presente especificação, incluindo definições, é soberana. Em adição, os materiais, métodos, e exemplos são meramente ilustrativa e não tem como intuito ser limitante.

Outras características e vantagens da invenção serão aparentes a partir da seguinte descrição detalhada, e a partir das reivindicações.

Definições:

Ao longo da especificação, uma referência pode ser feita utilizando uma abreviação de um nome de gene ou um nome de polipeptídeo, porém é entendido que tal nome de gene ou polipeptídeo abreviado representa o gênero de genes ou polipeptídeos, respectivamente. Tais nomes gênicos incluem todos

os genes codificando o mesmo polipeptídeo e polipeptídeos homólogos apresentando a mesma função fisiológica. Nomes de polipeptídeo incluem todos os polipeptídeos que apresentam a mesma atividade (*ex.*, que catalisam a mesma reação química fundamental).

Salvo quando indicado o contrário, os números de acesso referenciados aqui são derivados do banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information) mantido pelo National Institute of Health, E.U.A.. Salvo quando indicado o contrário, os números de acesso são como providos no banco de dados de março de 2008.

Números EC são estabelecidos pelo the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB) (available at http://www.chem.qmul/ac/uk/iubmb/enzyme/). Os números EC referenciados aqui são derivados do banco de dados KEGG Ligand, mantido pelo Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomics, financiado em parte pela Universidade de Tóquio. Salvo quando indicado o contrário, os números EC são como providos no banco de dados de março de 2008.

Os artigos "um" e "uma" são utilizados aqui para se referir a um ou mais de um (*i.e.*, a pelo menos um) dos objetos gramaticais do artigo. Por meio de exemplo, "um elemento" significa um elemento ou mais de um elemento.

O termo "por volta de" é utilizado aqui para significar um valor ± 20% de um dado valor numérico. Logo, "por volta de 60%" se refere a um valor de 60 ± (20% de 60) (*i.e.*, entre 48 e 70).

Como utilizado aqui, o termo "álcool desidrogenase" (EC 1.1.1.*) é um polipeptídeo capaz de catalisar a conversão de um aldeídos graxos em um álcool (*ex.*, um álcool graxo). Adicionalmente, alguém de habilidade básica na arte irá apreciar que algumas álcool desidrogenases irão catalisar outras reações também. Por exemplo, algumas álcool desidrogenases irão aceitar outros substratos em adição a aldeídos graxos. Tais álcool desidrogenases não específicas estão, portanto, também inclusas nessa definição. Sequências polinucleotídicas codificando álcool desidrogenases são conhecidas na arte, e tais desidrogenases são publicamente disponíveis.

O termo "propriedade alterada" se refere a uma modificação em uma ou mais propriedades de um polinucleotídeo mutante ou proteína mutante com referência a um polinucleotídeo precursor ou proteína precursora. Propriedades que podem ser vantajosamente alteradas no que diz respeito à proteínas feitas de acordo com a presente invenção incluem estabilidade oxidativa, especificidade de substrato, seletividade de substrato, atividade catalítica, estabilidade térmica, estabilidade de pH, perfil de atividade de pH, resistência a degradação proteolítica, K_m, k_{cat}, proporção k_{cat}/k_m, dobramento de proteína, indução de resposta imune, habilidade de ligação a um ligante, habilidade de ligação a um receptor, habilidade de ser secretada, habilidade de translocar de uma maneira ativa para uma membrana, habilidade de ser apresentada na superfície da célula, habilidade de oligomerizar, habilidade de sinalizar, habilidade de estimular a proliferação celular, habilidade de inibir a proliferação celular, habilidade de induzir apoptose, habilidade de ser modificada por fosforilação ou glicosilação,

habilidade para tratar doença. Em uma concretização da invenção, tioesterases mutantes são providas que derivam de uma tioesterase precursora, caracterizado pelo fato do mutante apresentar pelo menos uma propriedade alterada tanto *in vitro* ou *in vivo*, quando comparada às propriedades da tioesterase precursora. Em uma concretização, a propriedade alterada pode ser uma propriedade biofísica tal como estabilidade térmica (T_m de ponto de derretimento), estabilidade de solvente, estabilidade de soluto, estabilidade oxidativa, lipofilicidade, hidrofilicidade, estrutura quaternária, momento dipolo, ou ponto isoelétrico. Em uma concretização, a propriedade alterada pode ser uma propriedade bioquímica tal como pH ideal, temperatura ideal, força iônica ideal, e/ou um parâmetro catalítico de enzima (tal como, por exemplo, distribuição de produto, produtividade proporcional ou de porcentagem de produto, atividade específica, preferência de substrato, afinidade de substrato, inibição de substrato, afinidade de produto, taxa de renovação, inibição de produto, mecanismo cinético, K_M, k_{cat}, k_{cat}/K_m, e/ou V_{Max}). Em uma concretização, a propriedade alterada é uma preferência modificada para substratos particulares, como refletido em, por exemplo, uma preferência alterada por alcólise ou hidrólise, substratos de proteínas carreadoras acil-CoA ou acil-acil, substratos éster ou tioéster, substratos saturados ou insaturados, posição de insaturações, especificidade abrangente ou restrita (*ex.*, a habilidade de catalisar uma variedade de substratos ou somente substratos de um comprimento de cadeia de carbono específico). Em uma concretização, a propriedade alterada pode ser uma preferência ou atividade alterada para substratos ramificados, substratos apresentado uma posição

específica de ramificação, substratos hidróxi-acil, substrato ceto-acil, substratos que resultam em um produto apresentando atributos desejados de combustível (*i.e.*, número de cetano, taxa de octanagem, estabilidade oxidativa, lubricidade, ponto de inflamação, viscosidade, ponto de ebulição, ponto de derretimento, ponto de derramamento, ponto de turvação, ponto de entupimento de filtro a frio, características de fluxo a frio, aromaticidade, e/ou número de iodo). Propriedades alteradas também incluem um decréscimo na atividade ou atenuação de hidrólise de éster, tal como hidrólise de moléculas de produto desejadas, ou um decréscimo na toxicidade da proteína à célula e/ou uma modificação no nível de expressão da proteína na célula. Em uma concretização particular, a pelo menos uma propriedade alterada é, por exemplo, uma modificação na habilidade da tioesterase para catalisar a síntese de ésteres acil graxos diretamente ou indiretamente, *in vivo* ou *in vitro*, tal como através de transesterificação.

Como utilizado aqui, uma "sequência análoga" é uma caracterizada pelo fato da função do gene ser essencialmente a mesma que de um gene de referência tal como, por exemplo, o gene '*tesA* de *E. coli*. Adicionalmente, gene análogos incluem pelo menos por volta de 20%, por exemplo, pelo menos por volta de 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de um gene ou polinucleotídeo de referência tal como, por exemplo, a sequência polinucleotídica ou polipeptídica de um gene '*tesA* ou uma tioesterase 'TesA, respectivamente. Em concretizações adicionais mais de uma das propriedades acima se aplica à sequência.

Sequências análogas são determinadas através de métodos conhecidos de alinhamento de sequência.

O termo "alinhamento" se refere a um método de comparação de duas ou mais sequências polinucleotídicas ou polipeptídicas para o propósito de determinação de suas relações umas com as outras. Alinhamentos são tipicamente desempenhados por programas de computador que aplicam vários algoritmos, porém é também possível desempenhar um alinhamento a mão. Programas de alinhamento tipicamente iteram através de potenciais alinhamentos de sequências e pontuam os alinhamentos utilizando tabelas de substituição, empregando uma variedade de estratégias para alcançar uma pontuação de alinhamento ideal potencial. Algoritmos de alinhamento comumente utilizados incluem, porém não se limitam a, CLUSTALW, (*veja, Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J.*, CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, Nucleic Acids Research 22: 4673-4680, 1994); CLUSTALV, (*veja, Larkin M.A., et al.*, CLUSTALW2, ClustalW and ClustalX version 2, Bioinformatics 23(21): 2947-2948, 2007); *Jotun-Hein, Muscle et al.*, MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity, BMC Bioinformatics 5: 113, 2004); Mafft, Kalign, ProbCons, e T-Coffee (*veja Notredame et al.*, T-Coffee: A novel method for multiple sequence alignments, Journal of Molecular Biology 302: 205-217, 2000). Programas exemplares que implementam um ou mais dos algoritmos acima incluem, porém não se limitam a MegAlign da DNAStar (DNAStar, Inc. 3801 Regent St. Madison, WI 53705, EUA), MUSCLE, T-Coffee, CLUSTALX, CLUSTALV, JalView, Phylip, e Discovery Studio da Accelrys

(Accelrys, Inc., 10188 Telesis Ct, Suite 100, San Diego, CA 92121, EUA). Em um exemplo não limitante, MegAlign é utilizado para implementar o algoritmo de alinhamento CLUSTALW com os seguintes parâmetros: Penalidade de Intervalo 10, Penalidade de Comprimento de Intervalo 0,20, Atraso de Seqs Divergentes (30%), Peso de Transição de DNA 0,50, Matriz de Peso de Proteína Gonnet Series, Matriz de Peso de DNA IUB.

O termo "anticorpos" se referem a imunoglobulinas. Anticorpos incluem porém não são limitados a imunoglobulinas obtidas diretamente de qualquer espécie da qual é desejado para produzir anticorpos. Em adição, a presente invenção engloba anticorpos modificados. O termo também se refere a fragmentos de anticorpo que retêm a habilidade de se ligar ao mesmo epítopo ao qual o anticorpo intacto também se liga, e inclui anticorpos policlonais, anticorpos monoclonais, anticorpos quiméricos, anticorpos anti-idiotipo (anti-ID). Fragmentos de anticorpo incluem, porém não se limitam a regiões de determinação de complementaridade (CDRs), regiões variáveis de fragmento de cadeia simples (scFv), região variável de cadeia pesada (VH), região variável de cadeia leve (VL). Anticorpos policlonais e monoclonais são também englobados pela presente invenção. Preferencialmente, os anticorpos são anticorpos monoclonais.

O termo "atenuado" significa enfraquecer, reduzir ou diminuir. Em um exemplo, a sensibilidade de uma enzima particular a inibição autógena ou inibição causada por uma composição que não é um produto ou reatante (via específica não autógena) é reduzido de modo que a atividade de enzima não é impactada pela presença de um composto. Em um exemplo particular, a expressão

do gene *fabH* é sensível a temperatura e sua sequência pode ser alterada para diminuir a sensibilidade a flutuações de temperatura. Além disso, a expressão do gene *fabH* pode ser atenuada quando aminoácidos ramificados são desejados. Em outro exemplo, uma enzima que foi modificada a ser menos ativa pode ser referida como atenuada. Uma modificação funcional da sequência codificando uma enzima pode ser utilizada para atenuar a expressão de uma enzima. Modificações de sequência podem incluir, por exemplo, uma mutação, deleção, ou inserção de um ou mais nucleotídeos em uma sequência gênica ou uma sequência controlando a transcrição ou tradução de uma sequência gênica, cuja modificação resulta em uma redução ou inibição de produção do produto gênico, ou torna o produto gênica não funcional. Por exemplo, deleção funcional de *fabR* em *E. coli* reduz a repressão da via biossintética de ácido graxo e permite que *E. coli* produza mais ácidos graxos insaturados (UFAs). Em alguns exemplos uma deleção funcional é descrita como uma mutação nula. Outros métodos são disponíveis para atenuação de expressão de uma enzima. Por exemplo, atenuação pode ser alcançada através da modificação da sequência codificando o gene como descrito acima; colocando o gene sob o controle de um promotor menos ativo, expressando RNAs interferentes, ribozimas, ou sequências antissenso que tem como alvo o gene de interesse; através da modificação do ambiente físico ou químico, tal como temperatura, pH, ou concentração de soluto, de modo que a atividade ideal do gene ou produto gênico não seja obtida; ou através de qualquer outras técnicas conhecidas na arte.

O termo “biocrude” se refere a um biocombustível que pode ser utilizado como um substituto de combustíveis baseados em

petróleo. Em adição, "biocrude", como o "crude" de petróleo, pode ser convertido em outros combustíveis, por exemplo, gasolina, diesel, combustível de aviação, ou óleo de aquecimento. Além disso, "biocrude", como o "crude" de petróleo, pode ser convertido em outros químicos industrialmente úteis para uso em, por exemplo, medicamentos, cosméticos, bens de consumo, processos industriais, etc. Uma composição de "biocrude" pode conter, por exemplo, hidrocarbonos, produtos de hidrocarbono, ésteres de ácido graxo, e/ou cetonas alifáticas, ou uma combinação destes. Em uma concretização preferencial, uma composição de "biocrude" é composta de hidrocarbonos, por exemplo, hidrocarbonos alifáticos (*ex.*, alcanos, alcenos, alcinos) ou aromáticos.

O termo "biodiesel" se refere a um tipo particular de biocombustível que pode ser utilizado em motores a diesel. O biodiesel pode ser um substituto para o diesel tradicional, que é tipicamente derivado de petróleo. O biodiesel pode ser utilizado em motores a diesel de combustão interna tanto na forma pura, que é referida como biodiesel "limpo", quanto como uma mistura em qualquer concentração com um diesel baseado em petróleo. Uma composição de biodiesel pode também conter vários aditivos apropriados. O biodiesel pode ser composto por hidrocarbonos ou ésteres. Em uma concretização, o biodiesel é composto de ésteres graxos, tais como metil ésteres de ácido graxo (FAME) ou etil ésteres de ácido graxo (FAEE). Em uma concretização preferencial, esses FAME e FAEE são constituídos de porções de acil graxo apresentando comprimento de cadeia de carbono de por volta de 8-20, 10-18, ou 12-16. Ésteres graxos utilizados como biodiesel pode conter cadeias de carbono que são

simples, ramificadas, saturadas, ou insaturadas.

O termo "biocombustível" se refere a qualquer combustível derivado de biomassa. Biomassa é um material biológico que pode ser convertido em um biocombustível. Uma fonte exemplar de biomassa é matéria vegetal. Por exemplo, milho, cana-de-açúcar, e Panicum podem ser utilizadas como biomassa. Outro exemplo não limitante de biomassa é matéria animal, por exemplo estrume de vaca. Biomassa também inclui dejetos de indústria, agricultura, engenharia florestal e produtos domésticos. Exemplos de tais dejetos incluem, sem limitação, dejetos de fermentação, palha, serragem, esgoto, lixo e restos de comida e glicerol. Biomassa também inclui fontes de carbono, tais como carboidratos (*ex.*, açúcares). Biocombustíveis podem ser substituídos por combustíveis baseados em petróleo. Por exemplo, biocombustíveis são inclusivos de combustíveis de transporte (*ex.*, gasolina, diesel, combustível de aviação, etc.), combustíveis de aquecimento, e combustíveis geradores de eletricidade. Um biocombustível é uma fonte de energia renovável. Exemplos não limitantes de biocombustíveis incluem biodiesel, hidrocarbonos (*ex.*, alcanos, alcenos, alcinos, ou hidrocarbonos aromáticos), e alcoóis derivados de biomassa.

O termo "comprimento de cadeia de carbono" é definido aqui como o número de átomos de carbono em uma cadeia de carbono de um substrato de tioesterase ou um derivado de ácido graxo. O comprimento de cadeia de carbono de uma molécula particular é marcado como C_x , onde o subscrito "x" se refere ao número de carbonos na cadeia de carbono. Como utilizado aqui, o termo "cadeia longa" se refere àquelas moléculas que apresentam uma

cadeia de carbono de por volta de 15 a por volta de 20 carbonos de comprimento (*ex.*, C_{15}, C_{16}, C_{17}, C_{18}, C_{19}, ou C_{20}). O termo "cadeia curta" se refere àquelas moléculas que apresentam uma cadeia de carbono de por volta de 8 a por volta de 14 carbonos de comprimento (*ex.*, C_8, C_9, C_{10}, C_{11}, ou C_{12}).

O termo "fonte de carbono" significa um substrato ou composto apropriado para uso como fonte de carbono para crescimento celular de procarioto ou eucarioto simples. Fontes de carbono podem ser em várias formas, incluindo, porém não limitado a polímeros, carboidratos, ácidos, alcoóis, aldeídos, cetonas, aminoácidos, peptídeos, gases (*ex.*, CO e CO_2), e similares. Esses incluem, por exemplo, vários monossacarídeos tais como glicose, frutose, manose e galactose; oligossacarídeos tais como fruto-oligossacarídeo e galacto-oligossacarídeo; polissacarídeos tais como xilose, e arabinose; dissacarídeos tais como sacarose, maltose e turanose; material celulósico tais como metil celulose e sódio carbóximetil celulose; ésteres de ácido graxo saturados ou insaturados tais como sucinato, lactato e acetato; alcoóis tal como etanol, etc., ou misturas destes. A fonte de carbono pode adicionalmente ser um produto de fotossíntese, incluindo, porém não limitado a glicose. Glicerol pode também ser uma fonte efetiva de carbono. Fontes apropriadas de carbono podem ser geradas a partir de qualquer número de fontes naturais e renováveis, incluindo particularmente biomassa de lixo agrícola, municipal e industrial, contanto que o material possa ser utilizado como um componente de uma fermentação para prover uma fonte de carbono. Fontes de biomassa incluem restos de milho, cana-de-açúcar, Panicum, matéria animal, ou dejetos.

O termo "integração cromossomal" significa o processo pelo qual uma sequência de entrada é introduzida no cromossomo de uma célula hospedeira. Regiões homólogas do DNA transformante alinham com regiões homólogas do cromossomo. Então, a sequência entre as regiões de homologia pode ser substituída pela sequência de entrada em um "crossover" duplo *(i.e.,* recombinação homóloga). Em algumas concretizações da presente invenção, seções homólogas de um segmento cromossomal de inativação de uma construção de DNA alinham com as regiões homólogas flanqueadoras da região cromossomal nativa do cromossomo microbiano. Subsequentemente, a região cromossomal nativa é deletada pela construção de DNA em um "crossover" duplo.

O termo "ponto de turvação" se refere à temperatura de um líquido na qual os sólidos dissolvidos não estão mais completamente solúveis, precipitando como uma segunda fase e dando ao fluido uma aparência turva. Esse termo é relevante a um número de aplicações com consequência meio ou completamente diferentes. Na indústria petrolífera, ponto de turvação se refere à temperatura abaixo da qual cera ou outros hidrocarbonos pesados cristalizam em um óleo bruto, óleo refinado ou combustível para formar uma aparência turva. A presença de cera solidificada influencia o comportamento de fluxo do fluido, aumentando a tendência de entupimento de filtros/injetores de combustível e outras partes de máquina, causando o acúmulo de cera em superfícies frias (*ex.*, em superfícies de encanamentos ou superfícies de troca de calor), e alterando até as características de emulsificação com água. Ponto de turvação é uma indicação da tendência do óleo de entupir filtros ou pequenos orifícios em temperaturas de operação a frio. O ponto de turvação

de um surfactante não iônico ou solução de glicol é a temperatura na qual a mistura começa a separar em duas ou mais fases, logo se tornando turva. Esse comportamento é característico de surfactantes não iônicos contendo cadeias de polioxietileno, que podem exibir solubilidade reversa X comportamento de temperatura em água, e portanto podem turvar em algum ponto com o aumento da temperatura. Glicóis demonstrando esse comportamento são conhecidos como "glicóis de ponto de turvação" e são utilizados como inibidores de piçarra. O ponto de turvação é tipicamente também afetado pela salinidade, sendo geralmente menor em fluidos mais salinos.

O termo "aditivo para baixar o ponto de turvação" se refere a um aditivo que pode ser adicionado a uma composição para diminuir ou baixar o ponto de turvação da composição, como descrito acima.

O termo "condições que permitem a produção de produto" se refere a qualquer condição de fermentação que permite um hospedeiro de produção produzir um produto desejado, tal como acil-CoA ou derivados de ácido graxo incluindo, por exemplo, ácidos graxos, hidrocarbonos, alcoóis graxos, ceras, ou ésteres graxos. Condições de fermentação geralmente contêm muitos parâmetros. Condições exemplares incluem, porém não se limitam a, variações de temperatura, níveis de aeração, variação de pH, e composição de meio (*ex.*, solventes e solutos). Cada uma das condições, individualmente e em combinação, permite que o hospedeiro de produção cresça. Meios exemplares incluem caldos ou géis. Geralmente, um meio apropriado inclui uma fonte de carbono, tais como glicose, frutose, celulose, ou similares, que

pode ser metabolizada pelo microorganismo diretamente. Em adição, enzimas podem ser utilizadas no meio para facilitar a mobilização (*ex.*, a depolimerização de amido ou celulose em açúcares fermentáveis) e metabolismo subsequente da fonte de carbono. Para determinar se as condições de cultura são apropriadas para produção de produto, o hospedeiro de produção pode ser cultivado por aproximadamente 4, 8, 12, 24, 36, 48, ou 72 horas. Durante o cultivo e após o cultivo, amostras podem ser obtidas e analisadas para determinar se as condições de cultura permitem a produção de produto. Por exemplo, os hospedeiros de produção na amostra ou o meio na qual os hospedeiros de produção foram crescidos podem ser testados para a presença do produto desejado. Para testagem da presença de um produto, ensaios, tal como, porém não limitado a, TLC, HPLC, GC/FID, GC/MS, LC/MS, MS, assim como aqueles providos nos exemplos aqui, podem ser utilizados.

O termo "sequência consenso" ou "sequência canônica" se refere a uma sequência de aminoácido arquetípica contra a qual todas as variantes de uma proteína ou sequência de interesse são comparadas. Qualquer um dos termos também se refere a uma sequência que apresenta os nucleotídeos que são mais comumente presentes em uma sequência polinucleotídica de interesse. Para cada posição de uma proteína, a sequência consenso dá o aminoácido que é mais abundante naquela posição no alinhamento de sequência.

Como utilizado aqui, o termo "mutação consenso" se refere a uma diferença na sequência de um gene inicial e uma sequência consenso. Mutações consenso são identificadas através de

comparação de sequências do gene inicial e a sequência consenso resultante de um alinhamento de sequência. Em algumas concretizações, mutações consenso são introduzidas no gene inicial de modo que ele se torna mais similar à sequência consenso. Mutações consenso também incluem mudanças de aminoácidos que alteram um aminoácido em um gene inicial para um aminoácido que é mais frequentemente encontrado em um alinhamento múltiplo de sequência (MSA) naquela posição relativa à frequência daquele aminoácido no gene inicial. Logo, o termo "mutação consenso" se refere a qualquer alteração de aminoácido que substitui um aminoácido do gene inicial por um aminoácido que é mais abundante no MSA do que o aminoácido nativo.

O termo "substituições conservativas" ou "substituições conservadas" se refere a, por exemplo, uma substituição caracterizada pelo fato de uma ou mais das seguintes substituições de aminoácidos serem feitas: substituição de um aminoácido alifático, tais como alanina, valina, leucina, e isoleucina, por outro aminoácido alifático; substituição de uma serina por uma treonina; substituição de uma treonina por uma serina; substituição de um resíduo ácido, tais como ácido aspártico e ácido glutâmico, por outro resíduo ácido; substituição de um resíduo carregando um grupamento amida, tais como asparagina e glutamina, por outro resíduo carregando um grupamento amida; troca de um resíduo básico, tais como histidina, lisina e arginina, por outro resíduo básico; e substituição de um resíduo aromático, tais como triptofano, fenilalanina e tirosina, por outro resíduo aromático; ou substituição de aminoácidos pequenos, tais como glicina, alanina, serina, treonina e metionina, por outro aminoácido

pequeno. Substituições de aminoácidos que não alteram de modo geral a atividade específica são conhecidas na arte e são descritos, por exemplo, por *H. Neurath* e *R.L. Hill*, em The Proteins, Academic Press, Nova Iorque, 1979. Modificações conservativas úteis incluem Alanina por Cisteína, Glicina, ou Serina; Arginina por Isoleucina, Lisina, Metionina, ou Ornitina; Asparagina por Ácido aspártico, Glutamina, Ácido glutâmico, ou Histidina; Ácido aspártico por Asparagina, Glutamina, ou Ácido glutâmico; Cisteína por Metionina, Serina, ou Treonina; Glutamina por Asparagina, Ácido aspártico, ou Ácido glutâmico; Ácido glutâmico por Asparagina, Ácido aspártico, ou Glutamina; Glicina por Ácido aspártico, Alanina, ou Prolina; Histidina por Asparagina, ou Glutamina; Isoleucina por Leucina, Metionina, ou Valina; Leucina por Isoleucina, Metionina, ou Valina; Lisina por Arginina, Glutamina, Ácido glutâmico, Isoleucina, Metionina, ou Ornitina; Metionina por Cisteína, Isoleucina, Leucina, ou Valina; Fenilalanina por Histidina, L-Dopa, Leucina, Metionina, Treonina, Triptofano, Tirosina, 3-fenilprolina, 4-fenilprolina, ou 5-fenilprolina; Prolina por L-1-tioazolidina-4-ácido carboxílico ou D- ou L-1-oxazolidina-4-ácido carboxílico; Serina por Cisteína, Metionina, ou Treonina; Treonina por Metionina, Serina, ou Valina; Triptofano por Tirosina; Tirosina por L-Dopa, Histidina, ou Fenilalanina; e Valina por Isoleucina, Leucina, ou Metionina.

O termo "corresponde a" se refere a um resíduo de aminoácido em uma primeira sequência protéica sendo posicionalmente equivalente a um resíduo de aminoácido em uma segunda sequência protéica de referência devido ao fato de que o resíduo na sequência de referência utilizando técnicas de bioinformática,

por exemplo, utilizando os métodos descritos aqui para preparação de uma sequência de alinhamento. O resíduo correspondente na primeira sequência protéica é então designado o número de resíduo na segunda sequência protéica de referência. A primeira sequência protéica pode ser análoga à segunda sequência protéica ou não análogo à segunda sequência protéica, apesar de ser preferido que as duas sequências protéicas sejam sequências análogas. Por exemplo, quando a sequência de aminoácido de uma 'TesA de *E.coli*, na SEQ ID NO:31, é utilizada como uma sequência de referência, cada um dos resíduos de aminoácidos em outra proteína de interesse alinhada ou uma proteína análoga podem ser designados um número de resíduo correspondendo aos números de resíduo correspondendo ao número de resíduo correspondendo aos números de resíduo 1-182 de SEQ ID NO:31. Por exemplo, no **ANEXO 11**, as sequências de aminoácido alinhadas são referenciadas ou correspondidas com a sequência de uma 'TesA de *E.coli*. De acordo, uma dada posição em outra tioesterase de interesse, tanto um precursor ou uma tioesterase mutante, pode ser designada uma posição correspondente na sequência 'TesA, utilizando conhecidas técnicas de bioinformática tais como aquelas descritas aqui.

O termo "deleção", quando utilizado no contexto de uma sequência de aminoácido, significa uma deleção em ou a remoção de um resíduo da sequência de aminoácido de um proteína precursora, resultando em uma proteína mutante apresentando menos um resíduo de aminoácido quando comparado à proteína precursora. O termo pode também ser utilizado no contexto de uma sequência nucleotídica, que significa uma deleção em ou a remoção de um resíduo da sequência polinucleotídica de um

polinucleotídeo precursor.

O termo "derivado a partir de" e "obtido a partir de" se refere a, no contexto de uma tioesterase precursora, uma tioesterase produzida ou passível de ser produzida por uma cepa do organismo em questão, e também uma tioesterase codificada por uma sequência polinucleotídica isolada de tal cepa e produzida em um organismo hospedeiro contendo tal sequência polinucleotídica. Adicionalmente, os termos se referem a uma tioesterase que é codificada por uma sequência polinucleotídica de origem sintética e/ou de cDNA e que apresenta características de identificação da tioesterase em questão. Para exemplificar, "tioesterases derivadas de *Enterobacteriacaea*" se referem àquelas enzimas apresentando atividade de tioesterase que são produzidas naturalmente por *Enterobacteriacaea,* assim como a tioesterases como aquelas produzidas por fontes de *Enterobacteriacaea* porém que, através da utilização de técnicas de engenharia genética, são produzidas por organismos não *Enterobacteriocaea* transformados com um polinucleotídeo codificando a dita tioesterase.

O termo "construção de DNA" e "DNA transformante" são utilizados intercambiavelmente aqui para se referir a uma DNA utilizado para introduzir sequências em uma célula hospedeira ou organismo hospedeiro. Tipicamente uma construção de DNA é gerada *in vitro* por PCR ou outra(s) técnica(s) apropriada(s) conhecida(s) por aqueles na arte. Em certas concretizações, a construção de DNA contém uma sequência de interesse *(ex.,* uma sequência de entrada). Em algumas concretizações, a sequência está operacionalmente ligada a elementos adicionais tais como

elementos de controle (*ex.*, promotores, etc.). Uma construção de DNA pode adicionalmente conter um marcador de seleção. Ela pode também conter uma sequência de entrada flanqueada por regiões de homologia. Em uma concretização adicional, a construção de DNA contém outras sequências não homólogas, adicionadas às extremidades (*ex.*, sequências de enchimento ou flanqueadores). Em algumas concretizações, as extremidades da sequência de entrada é fechada de modo que a construção de DNA forma um círculo fechado. As sequências transformantes podem ser selvagem, mutante ou modificada. Em algumas concretizações, a construção de DNA contém sequências homólogas ao cromossomo da célula hospedeira. Em outras concretizações, a construção de DNA contém sequências não homólogas. Uma vez que a construção de DNA é montada *in vitro* ela pode ser utilizada para: 1) inserir sequências heterólogas em uma sequência alvo desejada de uma célula hospedeira; 2) mutagenizar uma região do cromossomo da célula hospedeira (*i.e.*, substituir uma sequência endógena por uma sequência heteróloga); 3) deletar genes alvo; e/ou (4) introduzir um plasmídeo replicante no hospedeiro.

Um polinucleotídeo é dito a "codificar" um RNA ou um polipeptídeo se, em seu estado nativo ou quando manipulado através de métodos conhecidos por aqueles versados na arte, ele pode ser transcrito e/ou traduzido para produzir o RNA, o polipeptídeo, ou um fragmento destes. A fita antissenso de tal polinucleotídeo é também dita a codificar as sequências de RNA ou polipeptídicas. Como é conhecido na arte, um DNA pode ser transcrito por uma RNA polimerase para produzir um RNA, e um RNA pode ser transcrito reversamente por uma transcriptase reversa para produzir um DNA. Logo um DNA pode codificar um RNA, e *vice*

versa.

O termo "equivalente", nesse contexto, se refere a enzimas tioesterases que são codificadas por um polinucleotídeo capaz de hibridizar com o polinucleotídeo apresentando a sequência de SEQ ID NO:31, sob condições de estringência de média a máxima. Por exemplo, sendo equivalente significa que uma tioesterase equivalente madura contém pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, e/ou pelo menos 99% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido de SEQ ID NO:31.

Uma "éster sintase" é um peptídeo capaz de catalisar uma reação bioquímica para produzir ésteres. Por exemplo, uma éster sintase é um peptídeo que é capaz de participar na conversão de um tioéster em um éster graxo. Em certas concretizações, uma éster sintase converte um tioéster, acil-CoA, em um éster graxo. Em uma concretização alternativa, uma éster sintase utiliza um tioéster e um álcool como substrato para produzir um éster graxo. Éster sintases são capazes de utilizar cadeias curtas e longas de acil-CoAs como substrato. Em adição, éster sintases são capazes de utilizar cadeias curtas e longas de alcoóis como substrato. Exemplos não limitantes de éster sintases incluem sintases de cera, sintases de cera-éster, acil-CoA:álcool transacilases, aciltransferases, acil graxo-coenzima:álcool graxo aciltransferases, acil graxo-ACP transacilase, e álcool acetiltransferase. Uma éster sintase que converte um acil-CoA tioéster em uma cera é chamada de cera sintase. Éster sintases

exemplares incluem aquelas classificadas sob o número de classificação EC 2.3.1.75. O termo "éster sintase" não engloba enzima que também apresentam atividade tioesterase. As que apresentam tanto a atividade de éster sintase quanto a atividade tioesterase são aqui categorizadas como tioesterases.

O termo "genes expressos" se referem a genes que são transcritos em RNA mensageiro (mRNA) e então traduzidos em proteínas, assim como genes que são transcritos em tipos de RNA, tais como RNA transportador (tRNA), RNA ribossomal (rRNA), e RNA regulatório, que não são traduzidos em proteína.

Os termos "cassete de expressão" ou "vetor de expressão" se referem a uma construção de polinucleotídeo gerada de maneira recombinante ou sintética, com uma série de elementos específicos que permitem a transcrição de um polinucleotídeo particular em uma célula alvo. Um cassete de expressão recombinante pode ser incorporado em um plasmídeo, cromossomo, DNA mitocondrial, DNA plasmidial, vírus, ou fragmento de polinucleotídeo. Tipicamente, a porção do cassete de expressão recombinante de um vetor de expressão inclui, dentre outras sequências, uma sequência polinucleotídica a ser transcrita e um promotor. Em concretizações particulares, vetores de expressão apresentam a habilidade de incorporar e expressar fragmentos polinucleotídicos heterólogos em uma célula hospedeira. Muitos vetores de expressão procarióticos e eucarióticos estão disponível comercialmente. A seleção de vetores de expressão apropriados está dentro do conhecimento daqueles versados na arte. O termo "cassete de expressão" é também utilizado intercambiavelmente aqui com "construção de DNA", e seus

equivalentes gramaticais.

O termo "derivado de ácido graxo", como utilizado aqui, se refere a uma composição que é derivada a partir de uma via metabólica, cuja via inclui uma reação de tioesterase. Logo, produtos de derivado de ácido graxo podem ser produtos que são, ou são derivados de, ácido graxo ou ésteres graxos que são produtos de uma reação de tioesterase. Derivados de ácido graxo portanto incluem, por exemplo, produtos que são, ou que são derivados a partir de, ácidos graxos que são o produto de reação direto de uma tioesterase, e/ou um éster graxo que é um produto de reação direto de uma tioesterase. Derivados de ácido graxo exemplares incluem, por exemplo, alcoóis de cadeia curta e longa, hidrocarbonos, e alcoóis e ésteres graxos, incluindo ceras, ésteres de ácido graxo, e/ou ésteres graxos. Exemplos não limitantes específicos de derivados de ácido graxo incluem ácidos graxos, metil ésteres de ácido graxo, etil ésteres de ácido graxo, alcoóis graxos, acil-acetatos graxos, aldeídos graxos, aminas graxas, amidas graxas, sulfatos graxos, éteres graxos, cetonas, alcanos, olefinas internas, olefinas terminais, ácidos dicarboxílicos, ácidos ω-dicarboxílicos, diols e ácidos graxos terminais e/ou internos.

O termo "enzimas de derivado de ácido graxo" se refere a, coletivamente e individualmente, enzimas que podem ser expressas ou super-expressas na produção de derivados de ácidos graxos. Essas enzimas podem ser parte de uma via biossintética de ácido graxo. Exemplos não limitantes de sintases de derivados de ácidos graxos incluem sintases de ácido graxo, tioesterases, acil-CoA sintases, acil-CoA redutases, álcool desidrogenases, álcool

acil-transferases, acil-CoA redutase formadora de álcool graxo, decarbonilases de ácido graxo, redutases de ácido carboxílico, acetiltransferases de álcool graxo, e éster sintase. Enzimas de derivado de ácido graxo convertem substratos em derivados de ácido graxo. Em certas circunstâncias, um substrato apropriado pode ser um primeiro derivado de ácido graxo, que é convertido por uma enzima de derivado de ácido graxo em um diferente, segundo derivado de ácido graxo.

O termo "álcool graxo" se refere a um álcool apresentando a fórmula ROH. Em certas concretizações, um álcool graxo é um álcool feito a partir de um ácido graxo ou derivado de ácido graxo. Em uma concretização, o grupamento R é de pelo menos por volta de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, ou 20 carbonos de comprimento. R pode ser cadeia simples ou ramificada. As cadeias simples podem apresentar um ou mais pontos de ramificação. Em adição, as cadeias ramificadas podem incluir ramificações cíclicas, tais como porções ciclopropano ou epóxido. Além disso, R pode ser saturado ou insaturado. Se insaturado, R pode apresentar um ou mais pontos de insaturação. Em uma concretização, o álcool graxo é produzido biossinteticamente. Alcoóis graxos apresentam muitos usos. Por exemplo, alcoóis graxos podem ser utilizados para produzir químicos especiais. Especificamente, alcoóis graxos podem ser utilizados como biocombustíveis; como solventes de gordura, ceras, gomas, e resinas; me bálsamos, emolientes e loções farmacêuticas; como aditivos de óleo lubrificante; em detergentes e emulsificantes; como agentes de anti-estática e acabamento em tecidos; como plastificantes; como surfactantes não iônicos; e em cosméticos, por exemplos como espessantes.

O termo "peptídeos formadores de álcool graxo" se refere a peptídeos capazes de catalisar a conversão de acil-CoA em álcool graxo, incluindo acil-CoA redutase formadora de álcool graxo (FAR, EC 1.1.1.*), acil-CoA redutase (EC 1.2.1.50) ou álcool desidrogenase (EC 1.1.1.1). Adicionalmente, alguém de habilidade básica na arte irá apreciar que alguns peptídeos formadores de álcool graxo irão catalisar outras reações também. Por exemplo, alguns peptídeos de acil-CoA redutase irão aceitar substratos diferentes de ácidos graxos. Tais peptídeos não específicos são, portanto, também inclusos. Sequências polinucleotídicas codificando peptídeos formadores de álcool graxo são conhecidos na arte e tais peptídeos estão disponíveis publicamente.

O termo "aldeído graxo" se refere a um aldeído apresentando a fórmula RCHO caracterizada por um grupamento carbonil insaturado (C=O). Em certas concretizações, um aldeído graxo é um aldeído feito a partir de um ácido graxo ou derivado de ácido graxo. Em uma concretização, o grupamento R é pelo menos por volta de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, ou 20 carbonos de comprimento. R pode ser cadeia simples ou ramificada. As cadeias ramificadas podem apresentar um ou mais pontos de ramificação. Em adição, as cadeias ramificadas podem incluir ramificações cíclicas. Além disso, R pode ser saturado ou insaturado. Se insaturado, R pode apresentar um ou mais pontos de insaturação. Em uma concretização, o aldeído graxo é produzido biossinteticamente. Aldeídos graxos apresentam muitos usos. Por exemplo, aldeídos graxos podem ser utilizados para produzir químicos especiais. Especificamente, aldeídos graxos podem ser utilizados para produzir polímeros, resinas, corantes, aromatizante, plastificantes, perfumes, remédios, e

outros químicos. Alguns são utilizados como solventes, preservativos, ou desinfetantes. Alguns compostos naturais e sintéticos, tais como vitaminas e hormônios, são também aldeídos.

Os termos "polipeptídeo biossintético de aldeído graxo", "redutase de ácido carboxílico" e "CAR" são utilizados aqui intercambiavelmente.

O termo "éster graxo" se refere a um éster apresentando mais que 5 átomos de carbono. Em certas concretizações, um éster graxo é um éster feito a partir de um ácido graxo, por exemplo um éster de ácido graxo. Em uma concretização, um éster graxo contém um lado A (*i.e.*, a cadeia de carbono presa ao oxigênio carboxilato) e um lado B (*i.e.*, a cadeia de carbono contendo o carboxilato parental). Em uma concretização particular, quando um éster graxo é derivado a partir de uma via biossintética de ácido graxo, o lado A é contribuído por um álcool, e o lado B é contribuído por um ácido graxo. Qualquer álcool pode ser utilizado para formar o lado A dos ésteres graxos. Por exemplo, o álcool pode ser derivado a partir da via biossintética de ácido graxo. Alternativamente, o álcool pode ser produzido através de vias biossintéticas de ácidos não graxos. Além disso, o álcool pode ser provido de maneira exógena. Por exemplo, o álcool pode ser provido ao caldo de fermentação em exemplos onde o éster graxo é produzido por um organismo. Alternativamente, um ácido carboxílico, tal como um ácido graxo ou um ácido acético, pode ser provido de maneira exógena em exemplos onde o éster graxo é produzido por um organismo que pode também produzir álcool. As cadeias de carbono contendo o lado A ou lado B pode ser de

qualquer comprimento. Em uma concretização, o lado A do éster é de pelo menos por volta de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 16, 18, ou 20 carbonos de comprimento. O lado B do éster é de pelo menos por volta de 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, ou 26 carbonos de comprimento. O lado A e/ou o lado B pode ser cadeia simples ou ramificada. As cadeias ramificadas podem apresentar um ou mais pontos de ramificação. Em adição, as cadeias ramificadas podem incluir ramos cíclicos, tais como porções ciclopropano ou epóxido. Além disso, o lado A e/ou lado B pode ser saturado ou insaturado. Se insaturado, o lado A e/ou lado B pode apresentar um ou mais pontos de insaturação. Em uma concretização, o éster graxo é produzido biossinteticamente. Nessa concretização, primeiramente o ácido graxo é "ativado". Exemplos não limitantes de ácidos graxos ativados são acil-CoA, acil ACP, acil-AMP, e acil fosfato. Acil-CoA pode ser um produto direto de biossíntese ou degradação de ácido graxo. Em adição, acil-CoA pode ser sintetizado a partir de um ácido graxo livre, um CoA, e uma adenosina nucleotídeo trifosfato (ATP). Um exemplo de uma enzima que produz acil-CoA é uma acil-CoA sintase. Após o ácido graxo ser ativado, ele pode ser prontamente transferido para um nucleófilo recipiente. Nucleófilos exemplares são alcoóis, tiols, aminas, ou fosfatos. Em outra concretização, o éster graxo pode ser derivado a partir de um acil-tioéster graxo e um álcool. Em uma concretização, o éster graxo é uma cera. A cera pode ser derivada a partir um álcool graxo de cadeia longa e um ácido graxo de cadeia longa. Em outra concretização, o éster graxo é um tioéster de ácido graxo, por exemplo acil Coenzima A (acil-CoA) graxa. Em outras concretizações, o éster graxo é um acil pantotenato graxo, uma proteína carreadora acil (acil-ACP),

um éster enzima acil graxo, ou mu éster fosfato graxo. Um éster pode ser formado a partir de um intermediário éster enzima acil através de alcólise da ligação éster para formar um novo éster e a enzima livre. Ésteres graxos apresentam muitos usos. Por exemplo, ésteres graxos podem ser utilizados como, ou como componente de, um biocombustível ou um surfactante.

O termo "éster graxo X outros derivados de ácido graxo" como utilizado aqui se refere à produtividade proporcional de éster graxo em comparação com a quantidade total de outros derivados de ácido graxo que não são ésteres graxos. Em outras palavras, a quantidade de ésteres graxos é comparada com a quantidade de derivados de ácido graxo diferentes de ésteres graxos.

O termo "produtividade de fermentação" ou "produtividade" se refere à taxa de produção de produto e é expressa g $L^{-1}h^{-1}$. Produtividade Específica é a produtividade normalizada para concentração do produto de catalisação e é expresso como g/g $L^{-1}h^{-1}$g (produto de catalisação)$^{-1}$.

O termo "titulação de fermentação" ou "titulação" se refere à concentração de um produto de reação, geralmente expressa como g/L mas também em outras unidades (*i.e.*, molar, massa/massa, massa/volume, ou volume/volume).

O termo "produtividade de fermentação" ou "produtividade" se refere à quantidade de produto produzido a partir de uma dada quantidade de material bruto e é geralmente expressa como a proporção de massa do produto produzido dividido pela massa de material bruto consumido (g produto/g material bruto). Ele pode

também ser expresso como produtividade molar (moles de produto/moles de material bruto).

O termo "fração de carbono moderno" se refere ao parâmetro "f_M" como definido pelo National Institute of Standards and Technology (NIST) Standard Reference Materials (SRMs) 4990B e 4990C, conhecido como padrões de ácidos oxálicos HOxI e HOxII, respectivamente. A definição fundamental se refere a 0,95 vezes a proporção de isótopo ^{14}C /^{12}C HOxI (referenciado a AD 1950). Isso é equivalente de maneira grosseira a madeira pré-Revolução Industrial com decaimento corrigido. Para a biosfera viva atual (material vegetal), f_M é por volta de 1.1.

O termo "ensaio funcional" se refere a um ensaio que provê uma indicação da atividade de uma proteína. Em concretizações particularmente preferenciais, o termo se refere a um sistema de ensaio na qual uma proteína é analisada para sua habilidade de funcionar na sua capacidade natural. Por exemplo, no caso de enzimas, um ensaio funcional envolve a determinação da eficácia da enzima em catalisar uma reação.

"Gene" se refere a um polinucleotídeo *(ex.*, um segmento de DNA), que codifica um polipeptídeo, e inclui regiões precedendo e seguindo as regiões codificantes assim como sequências intercaladas (íntrons) entre segmentos codificantes individuais (éxons).

O termo "genes homólogos" se referem a um par de genes de espécies diferentes porém relacionadas, que correspondem uma com a outra e que são idênticas ou similares uma com a outra. O termo engloba genes que são separados pelo processo de especiação

durante o desenvolvimento de novas espécies (*ex.*, genes ortólogos), assim como genes que forma separados por duplicação genética (*ex.*, genes parálogos).

O termo "proteína endógena" se refere a uma proteína que é nativa a ou que ocorre na natureza de uma célula. "Polinucleotídeo endógeno" se refere a um polinucleotídeo que está na célula e não foi introduzido na célula utilizando técnicas de engenharia recombinante. Por exemplo, um gene que estava presente na célula quando a célula foi originalmente isolada da natureza. Um gene é ainda considerado endógeno se as sequências de controle, tais como um promotor ou sequências intensificadoras que ativam a transcrição ou tradução, foram alterados através de técnicas recombinantes. Por outro lado, o termo "heterólogo" é também utilizado aqui, e se refere a uma proteína ou um polinucleotídeo que não ocorrem na natureza de uma célula hospedeira.

O termo "recombinação homóloga" se refere à troca de fragmentos de DNA entre duas moléculas de DNA ou cromossomos pareados em sítios de sequência nucleotídicas idêntica ou quase idêntica. Em certas concretizações, integração cromossomal é recombinação homóloga.

O termo "sequências homólogas" como utilizado aqui se refere a uma sequência polinucleotídica ou polipeptídica apresentando, por exemplo, por volta de 100%, por volta de 99% ou mais, por volta de 98% ou mais, por volta de 97% ou mais, por volta de 96% ou mais, por volta de 95% ou mais, por volta de 94% ou mais, por volta de 93% ou mais, por volta de 92% ou mais, por volta de 91% ou mais, por volta de 90% ou mais, por volta de 88% ou mais, por

volta de 85% ou mais, por volta de 80% ou mais, por volta de 75% ou mais, por volta de 70% ou mais, por volta de 65% ou mais, por volta de 60% ou mais, por volta de 55% ou mais, por volta de 50% ou mais, por volta de 45% ou mais, ou por volta de 40% ou mais de identidade de sequência com outra sequência polinucleotídica ou polipeptídica quando alinhados de maneira ideal para comparação. Em concretizações particulares, sequências homólogas podem reter o mesmo tipo e/ou nível de uma atividade particular de interesse. Em algumas concretizações, sequências homólogas apresentam 85% e 100% de identidade de sequência, enquanto em outras concretizações têm entre 90% e 100% de identidade de sequência. Em concretizações particulares, têm 95% e 100% de identidade de sequência.

"Homologia" se refere a similaridade de sequência ou identidade de sequência. Homologia é determinada utilizando técnicas padrão conhecidas na arte *(veja, ex., Smith* e *Waterman*, Adv. Appl. Math., 2:482, 1981; *Needleman* e *Wunsch*, J. Mol. Biol., 48:443, 1970; *Pearson* e *Lipman*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444, 1988; programas tais como GAP, BESTFIT, FASTA, e TFASTA no Pacote de Programas da Wisconsin Genetics (Genetics Computer Group, Madison, WI, EUA); e *Devereux et al.*, Nucl. Acid Res., 12:387-395, 1984). Um exemplo não limitante inclui o uso do programa BLAST (*Altschul et al.*, Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997) para identificar sequências que podem ser ditas a ser “homólogas”. Uma versão recente tais como versão 2.2.16, 2.2.17, 2.2.18, 2.2.19, ou a última versão, incluindo sub-programas tais como blastp para comparações proteína-proteína, blastn para comparações nucleotídeo-

nucleotídeo, tblastn para comparações proteína-nucleotídeo, ou blastx para comparações nucleotídeo-proteína, e com parâmetros como se segue: Número máximo de sequências retornadas 10.000 ou 100.000; E-value ("expectation value" ou valor esperado) de 1e-2 ou 1e-5, tamanho de palavra 3, matriz de pontuação BLOSUM62, custo de existência de intervalo 11, custo de extensão de intervalo 1, pode ser apropriado. Um E-value de 1e-5, por exemplo, indica a probabilidade de um pareamento homólogo ocorrer aleatoriamente é de por volta de 1 em 10.000, com isso marcando uma alta confiança de homologia verdadeira.

O termo "cepa hospedeira" ou "célula hospedeira" se refere a um hospedeiro apropriado para um vetor de expressão contendo um DNA da presente invenção.

O termo "hibridização" se refere ao processo pelo qual uma fita de polinucleotídeo se junta com uma fita complementar através de pareamento de bases, como conhecido na arte. Uma sequência polinucleotídica é considerada a ser "hibridizável seletivamente" com uma sequência polinucleotídica de referência se as duas sequências hibridizam especificamente uma com a outra sob estringência de hibridização e condições de lavagem de moderada a alta. Condições de hibridização são baseadas na temperatura de derretimento ou separação das fitas (T_m) do complexo de ligação ao polinucleotídeo ou sonda. Por exemplo, "estringência máxima" tipicamente ocorre a por volta de T_m-5°C (5°C abaixo da Tm da sonda); "alta estringência " a por volta de 5-10°C abaixo da T_m; "estringência intermediária" a por volta de 10-20°C abaixo da T_m da sonda; e "baixa estringência" a por volta de 20-25°C abaixo da T_m. Funcionalmente, condições de máxima

estringência podem ser utilizadas para identificar sequências apresentando identidade estrita ou identidade quase estrita com a sonda de hibridização; enquanto uma hibridização de estringência intermediária ou baixa pode ser utilizada para identificar ou detectar sequências polinucleotídicas de homólogos. Condições de hibridização de estringência moderada e alta são bem conhecidos na arte. Um exemplo de condições de alta estringência inclui hibridização a por volta de 42°C em formamida 50%, SSC 5X, solução de Denhardt 5X, SDS 0,5% e 100 pg/mL de DNA carreador desnaturado seguida por lavagem por duas vezes em SSC 2X e SDS 0,5% a temperatura ambiente e duas vezes adicionais em SSC 0,1X e SDS 0,5% a 42°C. Um exemplo de condições de estringência moderada inclui uma incubação durante a noite a 37°C em uma solução consistindo de formamida 20%, SSC 5X (150 mM de NaCl, 15 mM de citrato trisódio), 50 mM de fosfato de sódio (pH 7,6), solução de Denhardt 5X, 10% de sulfato dextran e 20 mg/mL de DNA de esperma de salmão sonicado desnaturado, seguido por lavagem de filtros em SSC 1X a por volta de 37 °C a por volta de 50°C. Aqueles versados na arte sabem como ajustar a temperatura, força iônica, e outras condições se necessário para acomodar fatores tais como comprimento de sonda e similares.

O termo “hidrocarbono” se refere a compostos químicos que contém os elementos carbono (C) e hidrogênio (H). Todos hidrocarbonos consistem de um esqueleto de carbono e átomos de hidrogênio anexados àquele esqueleto. Às vezes, o termo é utilizado como a forma reduzida do termo “hidrocarbono alifático”. Existem essencialmente três tipos de hidrocarbonos: (1) hidrocarbonos aromáticos, que apresentam pelo menos por volta de um anel aromático; (2) hidrocarbonos saturados, também

conhecidos como alcanos, que não apresentam ligações duplas, triplas ou aromáticas; e (3) hidrocarbonos insaturados, que apresentam uma ou mais ligações duplas ou triplas entre átomos de carbono e incluem, por exemplo, alcenos (*ex.*, dienos), e alcinos.

O termo "idêntico", no contexto de duas sequências polinucleotídicas ou polipeptídicas, significa que os resíduos nas duas sequências são os mesmos quando alinhados para correspondência máxima, como medida utilizando uma comparação de sequência ou análise de algoritmo tais como aqueles descritos aqui. Por exemplo, se quando propriamente alinhados, os segmentos correspondentes de duas sequências apresentam resíduos idênticos em 5 de 10 posições, é dito que as duas sequências apresentam uma identidade de 50%. A maior parte de programas de bioinformática reportam identidade de porcentagem sobre regiões de sequência alinhada, que não são tipicamente as moléculas inteiras. Se um alinhamento é longo o suficiente e contém suficientes resíduos idênticos, um valor esperado pode ser calculado, que indica que o nível de identidade no alinhamento é improvável de ocorrer ao acaso.

O termo "mutação de melhoramento" ou "mutação de aumento de desempenho" se refere a uma mutação em uma proteína que leva a propriedades alteradas, que confere desempenho melhorado em termos de um alvo e/ou propriedade desejada de uma proteína quando comparada a uma proteína precursora.

O termo "inserção", quando usado no contexto de uma sequência polipeptídica, se refere a uma inserção na sequência de aminoácidos de um polipeptídeo precursor, resultando em um

polipeptídeo mutante apresentando um aminoácido que está inserido entre dois aminoácidos contíguos existentes, *i.e.*, resíduos de aminoácidos adjacentes, que estão presentes no polipeptídeo precursor. O termo "inserção", quando usado no contexto de uma sequência polinucleotídica, se refere a uma inserção de um ou mais nucleotídeos no polinucleotídeo precursor entre dois nucleotídeos contíguos existentes, *i.e.*, nucleotídeos adjacentes, que estão presentes nos polinucleotídeos precursores.

O termo "introduzido" se refere a, no contexto de introduzir uma sequência polinucleotídica em uma célula, qualquer método apropriado para transferência da sequência polinucleotídica para dentro da célula. Tais métodos para introdução incluem porém não são limitados a fusão de protoplasto, transfecção, transformação, conjugação, e transdução (*veja, ex., Ferrari et al.*, Genetics, em *Hardwood et al,* (eds.), Bacillus, Plenum Publishing Corp., pág. 57-72, 1989).

O termo "isolado(a)" ou "purificado(a)" significa um material que é removido a partir de seu ambiente original, por exemplo, o ambiente natural se ele ocorre na natureza, ou um caldo de fermentação se ele é produzido em um meio de fermentação de célula hospedeira recombinante. Um material é dito ser "purificado" quando ele está presente em uma composição particular em uma concentração maior ou menor que a concentração que existe antes da(s) etapa(s) de purificação. Por exemplo, no que diz respeito a uma composição normalmente encontrada em um organismo que ocorre na natureza ou selvagem, tal composição é "purificada" quando a composição final não inclui algum material

da matriz original. Como outro exemplo, onde a composição é encontrada em combinação com outros componentes em um meio de fermentação de célula hospedeira recombinante, aquela composição é purificada quando o meio de fermentação é tratada de modo a remover algum componente da fermentação, por exemplo, resto celular ou outros produtos de fermentação, através de, por exemplo, centrifugação e destilação. Como outro exemplo, um polinucleotídeo ou polipeptídeo que ocorre na natureza presente em um animal vivo não é isolado, porém o mesmo polinucleotídeo ou polipeptídeo, separado de algum ou todo o material coexistente no sistema natural, é isolado, tanto se tal processo é através de engenharia genética quanto de separação mecânica. Tais polinucleotídeos podem ser partes de vetores. Alternativamente, tais polinucleotídeos ou polipeptídeos podem ser partes de composições. Tais polinucleotídeos ou polipeptídeos podem ser considerados "isolados" porque os vetores ou composições contendo estes não são parte dos seus ambientes naturais. Em outro exemplo, um polinucleotídeo ou proteína é dita a ser purificada se ele dá origem a essencialmente uma banda em um gel de eletroforese ou um blot.

O termo "maduro(a)", no contexto de uma proteína, significa a forma de uma proteína ou peptídeo que está em sua forma funcional final. Para exemplificar, uma forma madura de uma tioesterase da presente invenção contém os resíduos de aminoácido 1-182 de SEQ ID NO:31.

O termo "derivados de ácido graxo modificado" se refere a produtos feitos, pelo menos em parte, a partir de uma parte da via biossintética de ácido graxo de uma célula hospedeira

recombinante, caracterizado pelo fato do produto diferir do produto feito pela tal célula hospedeira na ausência da tioesterase mutante da invenção. Logo, onde uma tioesterase mutante (ou equivalente desta que ocorre na natureza) é introduzida em uma célula hospedeira recombinante, resultando na produção de um derivado de ácido graxo que apresenta um perfil de produto diferente, por exemplo, uma concentração maior ou menor de certos derivados de ácido graxo apresentando um comprimento específico de cadeia, ou uma concentração maior ou menor de um certo tipo de derivado de ácido graxo, aquele material de ácido graxo é "modificado" dentro do contexto dessa invenção.

O termo "tioesterase mutante" ou "tioesterase variante" se refere a uma tioesterase que contém uma mutação com referência à tioesterase precursora.

O termo "mutação" se refere a, no contexto de um polinucleotídeo, uma modificação à sequência polinucleotídica resultando em uma alteração na sequência de um polinucleotídeo com referência a uma sequência polinucleotídica precursora. Uma sequência polinucleotídica mutante pode se referir a uma alteração que não muda a sequência de aminoácido codificada, por exemplo, no que diz respeito a otimização de códon para propósitos de expressão, ou que modifique um códon de modo que como resultado em uma modificação da sequência de aminoácido codificada. Mutações podem ser introduzidas em um polinucleotídeo através de qualquer número de métodos conhecidos por aqueles versados na arte, incluindo mutagênese aleatória, mutagênese sítio-específico, mutagênese direcionada por

oligonucleotídeo, embaralhamento de genes, técnicas de evolução direcionada, mutagênese combinatorial, mutagênese de saturação de sítio entre outras.

"Mutação" ou "mutado(a)" significa, no contexto de uma proteína, uma modificação na sequência de aminoácidos resultando em uma alteração na sequência de uma proteína com referência a uma sequência de proteína precursora. Uma mutação pode se referir a uma substituição de um aminoácido por outro aminoácido, uma inserção ou uma deleção de um ou mais resíduos de aminoácidos. Especificamente, uma mutação pode também ser a substituição de um aminoácido por um aminoácido não natural, ou por um aminoácido modificado quimicamente ou resíduos similares. Uma mutação pode também ser uma truncagem (*ex.*, uma deleção ou interrupção) em uma sequência ou uma sub-sequência a partir da sequência precursora. Uma mutação pode também ser uma adição de uma sub-sequência (*ex.*, dois aminoácidos ou mais em uma porção, que são inseridos entre dois aminoácidos contíguos em uma sequência de proteína precursora) dentro de uma proteína, ou em qualquer uma das extremidades de uma proteína, com isso aumentando o comprimento da (ou alongando a) proteína. Uma mutação pode ser feita através de modificação da sequência de DNA correspondendo à proteína precursora. Mutações podem ser introduzidas em uma sequência protéica através de métodos conhecidos na arte, por exemplo, através da criação de sequências de DNA sintéticas que codificam a mutação com referência a proteínas precursoras, ou alterando quimicamente a própria proteína. Um "mutante" como usado aqui é uma proteína contendo uma mutação. Por exemplo, é também possível fazer um mutante através da substituição de uma porção de uma tioesterase com uma sequência selvagem que

corresponde a tal porção porém inclui um variação desejada em uma posição específica que ocorre na natureza na sequência selvagem.

Um(a) "equivalente que ocorre na natureza", no contexto da presente invenção, se refere a uma tioesterase que ocorre na natureza, ou uma porção desta, que contém um resíduo que ocorre na natureza, caracterizado pelo fato do resíduo que ocorre na natureza corresponder a uma mutação em 'TesA (*ex.*, uma mutação em SEQ ID NO:31) que introduziu uma propriedade alterada desejada em 'TesA. Exemplos de tioesterases equivalentes que ocorrem na natureza apresentando tais modificações são providas no anexo 12.

O termo "operacionalmente ligado(a)", no contexto de uma sequência polinucleotídica, se refere à colocação de uma sequência polinucleotídica em uma relação funcional com outra sequência polinucleotídica. Por exemplo, um DNA codificando um líder secretório (*ex.*, um peptídeo sinal) está operacionalmente ligado a um DNA codificando um polipeptídeo se ele é expresso como uma pré-proteína que participa na secreção do polipeptídeo. Um promotor ou um intensificador está operacionalmente ligado a uma sequência codificantes se ele afeta a transcrição da sequência. Um sítio de ligação de ribossomo está operacionalmente ligado a uma sequência codificante se ele está posicionado de modo a facilitar a tradução. De modo geral, "operacionalmente ligado(a)" significa que as sequências de DNA sendo ligadas são contíguas, e, no caso de um líder secretório, contíguo e na mesma fase de leitura.

O termo "região de operon" se refere a um grupo de genes

contíguos que são transcritos como uma unidade de transcrição única a partir de um promotor em comum, e são portanto sujeitos a co-regulação. Em algumas concretizações, o operon inclui um gene regulatório.

O termo "alinhamento ideal" se refere ao alinhamento que gera a pontuação de alinhamento geral mais alta.

O termo "ortólogos" ou "genes ortólogos" se referem a genes em espécies diferentes que evoluíram a partir de um gene ancestral comum através de especiação. Tipicamente, ortólogos retém a mesma função durante o curso de evolução. Identificação de ortólogos encontra uso na predição confiável da função gênica em genomas recém sequenciados.

"Super-expresso(a)" ou "super-expressão" em uma célula hospedeira ocorre se a enzima é expressa na célula em um nível mais alto que o nível na qual ela é expressa em uma célula selvagem correspondente.

O termo "parálogo" ou "genes parálogos" se referem a genes que são relacionados através de duplicação dentro de um genoma. Enquanto ortólogos retêm a mesma função através do curso de evolução, parálogos desenvolvem novas funções, mesmo que algumas funções sejam geralmente relacionadas à função original. Exemplos de genes parálogos incluem, porém não se limitam a, genes codificando mioglobina e hemoglobina, que surgiram a partir do mesmo ancestral porém desenvolveram funções diferentes.

O termo "coeficiente de partição" significa a concentração

de equilíbrio de um composto em uma fase orgânica dividida pela concentração em equilíbrio na fase aquosa (*ex.*, em um caldo de fermentação). Em uma concretização do sistema bifásico descrito aqui, a fase orgânica é formada pelo derivado de ácido graxo durante o processo de produção. Em certas circunstâncias, uma fase orgânica pode também ser provida, por exemplo, uma camada de octano pode ser provida ao caldo de fermentação para facilitar a separação de produto. Quando descrevendo um sistema de duas fases, o coeficiente de partição, P, é geralmente discutido em termos de logP. Um composto com um logP de 1 se partiria a 10:1 da fase orgânica. Um composto com um logP de -1 se partiria a 1:10 da fase orgânica. Através da escolha de um caldo de fermentação e fase orgânica apropriados, um derivado de ácido graxo com um valor alto de logP irá se separar em fase orgânica mesmo em concentrações muito baixas no recipiente de fermentação.

Os termos "percentual de identidade de sequência", "percentual de identidade de sequência de aminoácido", "percentual de identidade de sequência gênica" e/ou "percentual de identidade de sequência polinucleotídica", no que diz respeito a dois polipeptídeos, polinucleotídeos e/ou sequências gênicas (como apropriado), se referem a porcentagem de resíduos que são idênticos nas duas sequências quando as sequências são alinhadas de maneira ideal. Logo, identidade de sequência de aminoácido de 80% significa que 80% dos aminoácidos nas duas sequências polipeptídicas alinhadas de maneira ideal são idênticos.

O termo "plasmídeo" se refere a uma construção de DNA dupla-

fita (ds) circular utilizado como um vetor de clonagem, e que forma um elemento genético auto-replicante extracromossomal em alguns eucariotos ou procariotos, ou se integra ao cromossomo hospedeiro.

O termo "tioesterase precursora" se refere a uma proteína tioesterase a partir da qual uma tioesterase mutante da invenção pode ser derivada, através de, por exemplo, meio recombinantes ou químicos. Exemplos de tioesterases precursoras são as que ocorrem na natureza ou tioesterases selvagens de fontes vegetais, animais ou microbianas. Uma tioesterase precursora pode também ser uma tioesterase que não ocorre na natureza. Um exemplo de uma tioesterase que não ocorre na natureza é uma tioesterase feitas através de, por exemplo, mutação aleatória, síntese química, evolução molecular, ou mutagênese sítio dirigida, que pode servir como um ponto de início útil para o desenho e/ou a confecção de tioesterases mutantes da invenção.

Um "oligo" é um oligonucleotídeo, tanto que ocorre na natureza como em uma amostra de digestão de restrição purificada, quanto produzido sinteticamente, que é capaz de agir como um ponto de iniciação de síntese quando colocado sob condições nas quais a síntese de um produto de extensão de oligo que é complementar a uma fita de polinucleotídeo de referência é induzida. Condições apropriadas incluem, por exemplo, a presença de nucleotídeos e um agente indutor tal como uma DNA polimerase, e uma temperatura e pH apropriados. Um oligo é preferencialmente fita simples para eficiência máxima na amplificação, porém pode alternativamente ser dupla fita. Se dupla fita, um oligo pode ser primeiramente tratado para separar suas fitas antes de ser

utilizada para preparar produtos de extensão. Em concretizações particulares, um oligo é um oligodeoxirribonucleotídeo. Em certas concretizações preferenciais, um oligo é suficientemente comprido para iniciar a síntese de produtos de extensão na presença de um agente indutor. Os comprimentos exatos de oligos irão depender de um número de fatores, incluindo temperatura, fonte de oligo, e os métodos utilizados para amplificação.

O termo "sonda" se refere a um oligonucleotídeo, tanto que ocorre na natureza como em um produto de digestão de restrição purificado quanto produzido sinteticamente, recombinantemente ou através de amplificação por PCR, que é capaz de hibridização com outro oligonucleotídeo de interesse. Uma sonda pode ser fita simples ou dupla fita. Sondas são úteis na detecção, identificação e isolamento de sequências gênicas particulares. É contemplado que qualquer sonda utilizada na presente invenção será marcada com qualquer "molécula repórter" de modo que é detectável em qualquer sistema de detecção, incluindo, porém não limitado a sistemas de enzima (*ex.*, ELISA ou outros ensaios histoquímicos baseados em enzima), fluorescentes, radioativos, e luminescentes. Não é o intuito que a presente invenção seja limitada a qualquer sistema de detecção ou marcação particulares.

Um "hospedeiro de produção" é uma célula utilizada para produzir produtos. Como revelado aqui, um hospedeiro de produção é modificado para expressar ou super-expressar genes selecionados, ou para apresentar expressão atenuada de genes selecionados. Exemplos não limitantes de hospedeiros de produção incluem células vegetais, animais, humanas, bacterianas, de

leveduras, de cianobactérias, de algas, e/ou fungos filamentosos.

Um "promotor" é uma sequência polinucleotídica que funciona para direcionar a transcrição de um gene a jusante. Em concretizações preferenciais, o promotor é apropriado à célula hospedeira na qual o gene alvo está sendo expresso. O promotor, juntamente com outras sequências polinucleotídica regulatórias transcricionais e traducionais (também chamadas de "sequências controle") é necessário para expressar um dado gene. Em geral, as sequências regulatórias transcricionais e traducionais incluem, porém não são limitadas a, sequências promotoras, sítios de ligação de ribossomo, sequências de início e término de transcrição, sequências de início e término de tradução, e sequências intensificadoras ou ativadoras.

O termo "promotores" ou "intensificadores" se referem a sinais de controle de transcrição em eucariotos. Promotores e intensificadores consistem de pequenos arranjos de sequências de DNA que interagem especificamente com proteínas celulares envolvidas na transcrição (*Maniatis et al.*, Science, 236:1237, 1987). Elementos promotores e intensificadores foram isolados de uma variedades de fontes eucarióticas incluindo genes em células de levedura, insetos, mamíferos e plantas. Elementos promotores e intensificadores foram também isolados a partir de vírus. Elementos de controle análogo, tais como promotores e intensificadores, são também encontrados em procariotos. A seleção de um promotor e intensificador particular depende do tipo celular utilizado para expressar a proteína de interesse. Alguns promotores e intensificadores eucarióticos e

procarióticos apresentam uma vasta variedade de células hospedeiras de produção enquanto outros são funcionais em um subconjunto limitado de células hospedeiras de produção (*veja, ex.*, *Voss et al.*, Trends Biochem. Sci., 11:287, 1986; *Maniatis et al.*, 1987, *supra*). O termo "elemento promotor", "promotor" ou "sequência promotora" se refere a uma sequência de DNA que funciona como um interruptor que ativa a expressão de um gene. Se o gene é ativado, ele é dito ser transcrito, ou participante na transcrição. A transcrição envolve a síntese de mRNA a partir do gene. O promotor, portanto, serve como um elemento regulatório transcricional e também provê um sítio para iniciação de transcrição do gene em mRNA.

O termo "propriedade" se refere a, no contexto de um polinucleotídeo, qualquer característica ou atributo de um polinucleotídeo que pode ser selecionado ou detectado. Essas propriedades incluem, porém não se limitam a, uma propriedade afetando a ligação a um polipeptídeo, uma propriedade conferida em uma célula contendo um polinucleotídeo particular, uma propriedade afetando a transcrição gênica (*ex.*, força do promotor, reconhecimento do promotor, regulação do promotor, função de intensificador), uma propriedade afetando o processamento de RNA (*ex.*, "splicing" de RNA, estabilidade de RNA, conformação de RNA, e modificação pós-transcricional), uma propriedade afetando a tradução (*ex.*, nível, regulação, ligação de mRNA a proteínas ribossomais, modificação pós-traducional). Por exemplo, um sítio de ligação para um fator transcricional, polimerase, fator regulatório, e similares, de um polinucleotídeo pode ser alterado para produzir características desejadas ou para identificar características indesejadas.

O termo "propriedade" se refere a, no contexto de uma proteína, qualquer característica ou atributo de uma proteína que pode ser selecionada ou detectada.

Os termos "proteína" e "polipeptídeo" são utilizados intercambiavelmente aqui. O código de 3 letras assim como o código de 1 letra para resíduos de aminoácidos como definido na conformidade com a IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN) é usado ao longo dessa revelação. É também entendido que um polipeptídeo pode ser codificado por mais de uma sequência polinucleotídica devido à degeneração do código genético. Uma enzima é uma proteína.

Os termos "produtividade proporcional" e "produtividade de porcentagem" são utilizados intercambiavelmente aqui. Eles se referem à quantidade de um produto desejado em relação a outros produtos que são dentro da mesma mistura produzidos por um hospedeiro recombinante da presente invenção. Por exemplo, a produtividade proporcional de um produto desejado pode ser melhorado de modo que ele é mais predominante do que outros componentes na mistura de produto para reduzir a dificuldade de purificação. Em outro exemplo, a produtividade proporcional de um produto indesejado (*i.e.*, um componente que irá precisar ser removido do produto desejado) pode ser reduzida de modo que ele é menos predominante do que o componente desejado na mistura de produto para alcançar o mesmo propósito. Produtividades proporcionais são expressas aqui na forma de "x X outros derivados de ácido graxo", que compara a quantidade de x, que é um tipo de derivado de ácido graxo (*ex.*, um éster graxo, um derivado de ácido graxo de um comprimento de cadeia particular),

e o termo "outros derivados de ácido graxo" significa a quantidade agregada de todos derivados de ácido graxo com exceção de x que são produzidos na mesma corrida de experimento, cultura, ou fermentação.

O termo "pró-sequência" se refere a uma sequência de aminoácido entre a sequência sinal e proteína madura que é necessária para a secreção da proteína. Clivagem da pró-sequência pode levar a uma proteína/enzima ativa madura sob certas circunstâncias e condições apropriadas.

O termo "recombinante", quando utilizado para modificar o termo "célula" ou "vetor" aqui, se refere a uma célula ou vetor que foi modificado através da introdução de uma sequência polinucleotídica heteróloga, ou que a célula é derivada a partir de uma célula então modificada. Logo, por exemplo, células recombinantes expressam genes que não são encontrados na forma idêntica dentro das formas nativas (não recombinantes) das células ou expressam, como um resultado de intervenção humana deliberada, genes nativos que são de outro modo expresso anormalmente, sub-expresso ou, de fato, não expresso. Os termos "recombinação", "recombinante" e gerando um polinucleotídeo "recombinado" se refere geralmente à montagem de dois ou mais fragmentos de polinucleotídeo caracterizado pelo fato da montagem gerar um polinucleotídeo quimérico feito a partir das partes montadas.

O termo "segmento regulatório", "sequência regulatória" ou "sequência de controle de expressão" se refere a uma sequência polinucleotídica que está operacionalmente ligada com outra sequência polinucleotídica que codifica a sequência de

aminoácidos de uma cadeia polipeptídica para efetuar a expressão daquela sequência de aminoácido codificada. A sequência regulatória pode inibir, reprimir, promover, ou mesmo direcionar a expressão da sequência polinucleotídica operacionalmente ligada codificando a sequência de aminoácidos.

O termo "marcador de seleção" ou "marcador seletivo" se refere a um polinucleotídeo *(ex.,* um gene) capaz de se expressar em uma célula hospedeira, que permite a facilidade de seleção daqueles hospedeiros contendo o vetor. Exemplos de marcadores de seleção incluem porém não se limitam a marcadores antimicrobianos. Logo, o termo "marcador de seleção" se refere a um gene que provê uma indicação quando uma célula hospedeira adquire uma sequência de entrada de interesse ou quando alguma outra reação acontece. Tipicamente, marcadores de seleção são genes que conferem resistência antimicrobiana ou uma vantagem metabólica nas células hospedeiras que permitem que as células que contêm as sequências exógenas sejam distinguidas das células que não receberam as sequências exógenas. Um "marcador de seleção residente" é um que está localizado no cromossomo do microorganismo a ser transformado. Um marcador de seleção residente codifica um gene que é diferente do marcador de seleção na construção transformante. Marcadores seletivos são conhecidos por aqueles versados na arte. Como indicado acima, o marcador apropriado é um marcador de resistência antimicrobiano, incluindo, por exemplo, amp^R; $phleo^R$; $spec^R$; kan^R; ery^R; tet^R; cmp^R; e neo^R. *Veja, ex., Guerot-Fleury*, Gene, 167:335-337, 1995; *Palmeros et al.,* Gene, 247:255-264, 2000; e *Trieu-Cuot et al., Gene,* 23:331-341, 1983. Outros marcadores úteis de acordo com a invenção incluem, porém não se limitam a, marcadores

auxotróficos, tais como triptofano; e marcadores de detecção, tais como 6-galactosidase.

O termo "sequência nucleotídica codificando marcador de seleção" se refere a uma sequência polinucleotídica que é capaz de se expressar nas células hospedeiras e onde a expressão do marcador de seleção confere às células contendo o gene expresso a habilidade de crescer na presença de um agente seletivo correspondente ou na ausência de um ou mais nutrientes essenciais.

Uma "sequência sinal" ou "peptídeo sinal" se refere a uma sequência polinucleotídica ou de aminoácidos que participa na secreção das formas maduras ou precursoras de uma proteína. Essa definição de sequência sinal é uma funcional, com o intuito de incluir aquelas sequências de aminoácidos codificadas pela porção N-terminal do gene da proteína, que participa na efetivação da secreção de proteína. Elas estão, geralmente, porém não universalmente, ligada à porção N-terminal de uma proteína precursora. A sequência sinal pode ser endógena ou exógena. A sequência sinal pode ser uma que está normalmente associada com a proteína *(ex.,* tioesterase), ou pode ser uma originada ou derivada a partir de um gene codificando outra proteína secretada. Uma sequência sinal exógena exemplar contém os primeiros sete resíduos de aminoácido da sequência sinal de subtilisina de *Bacillus subtilis* fusionada com o restante da sequência sinal da subtilisina de *Bacillus lentus* (ATCC 21536). Outra sequência sinal exemplar contém a sequência sinal de TesA que é removida para produzir 'TesA.

O termo "substancialmente idêntico", no contexto de dois

polinucleotídeos ou dois polipeptídeos que contém pelo menos 70% de identidade de sequência, por exemplo, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, ou pelo menos 99% de identidade de sequência quando comparado a uma sequência de referência utilizando os programas ou algoritmos (*ex.*, BLAST, ALIGN, CLUSTAL) utilizando parâmetros padrão. Uma indicação de que dois polipeptídeos são substancialmente idênticos pode ser que o primeiro polipeptídeo tenha reação imunologicamente cruzada com o segundo polipeptídeo. Tipicamente, polipeptídeos que diferem por substituições conservativas de aminoácidos apresenta reação imunologicamente cruzada. Logo, um polipeptídeo é substancialmente idêntico a um segundo polipeptídeo, por exemplo, quando os dois peptídeos diferem somente por uma substituição conservativa. Outra indicação de que duas sequências polinucleotídicas são substancialmente idênticas é que as duas moléculas hibridizam uma com a outra sob condições estringentes (*ex.*, dentro de um espectro de média a máxima estringência).

"Substancialmente purificado(a)" significa moléculas que são pelo menos por volta de 60% livre de, preferencialmente pelo menos por volta de 75% livre de, por volta de 80% livre de, por volta de 85% livre de, e mais preferencialmente pelo menos por volta de 90% livre de outros componentes com os quais eles estão naturalmente associados. Como utilizados aqui, o termo "purificado(a)" ou "purificar" também se refere à remoção de contaminantes de uma amostra. Por exemplo, a remoção de contaminantes pode resultar em um aumento na porcentagem de

derivados de ácido graxo de interesse em uma amostra. Por exemplo, após derivados de ácido graxo serem expressos em células hospedeiras de produção de planta, bactéria, levedura, ou mamífero, os derivados de ácido graxo podem ser purificados através de, *ex.*, remoção de proteínas de célula hospedeira de produção. Essa etapa, também chamada de recuperação, envolve a separação e processamento de composição de derivado de ácido graxo de modo que a composição é útil em aplicações industriais, por exemplo, como um combustível ou um químico. Após purificação, a porcentagem de derivados de ácido graxo na amostra é aumentada. O termo purificado não requer pureza absoluta; ao invés, ele tem com intuito ser um termo relativo. Logo, por exemplo, uma preparação de derivados de ácido graxo purificado é uma na qual o produto é mais concentrado que o produto está no seu ambiente dentro de uma célula. Por exemplo, um éster graxo purificado é um que está substancialmente separado de componentes celulares (*ex.*, polinucleotídeos, lipídeos, carboidratos, e outros peptídeos) que podem acompanhá-lo. Em outro exemplo, uma preparação de éster graxo purificado é uma na qual o éster graxo está substancialmente livre de contaminantes, tais como aqueles que podem estar presentes seguindo fermentação. Por exemplo, um éster graxo é dito ser "purificado" quando pelo menos por volta de 50% por peso de uma amostra é composta do éster graxo. Em outro exemplo quando pelo menos por volta de 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% ou mais por peso de uma amostra é composta pelo éster graxo.

"Substituição" significa substituir um aminoácido na sequência de uma proteína precursora com outro aminoácido em uma posição particular, resultando em um mutante da proteína

precursora. O aminoácido utilizado como um substituto pode ser um aminoácido que ocorre na natureza, ou pode ser um aminoácido sintético ou que não ocorre na natureza.

O termo "surfactantes" se refere a substâncias que são capazes de reduzir a tensão superficial de um líquido no qual eles estão dissolvidos. Eles são tipicamente compostos de uma cabeça solúvel em água e uma cadeia ou cauda de hidrocarbono. A cabeça solúvel em água é hidrofílica e pode ser tanto iônica quanto não iônica. A cadeia de hidrocarbono é hidrofóbica. Surfactantes são utilizados em uma variedade de produtos, incluindo detergentes e soluções de limpeza, e são também utilizados como auxiliares em tecido, couro e papel, em processos químicos, em cosméticos e remédios, na indústria alimentícia, na agricultura, e na recuperação de óleo. Em adição, eles podem ser utilizados no auxílio na extração e isolamento de óleos brutos que são encontrados em ambientes de difícil acesso ou em emulsões de água. Existem quatro tipos de surfactantes caracterizada através de variação de usos. Surfactantes aniônicos apresentam atividade do tipo detergente e são geralmente utilizados para aplicações de limpeza. Surfactantes catiônicos contêm cadeias longas de hidrocarbonos e são geralmente utilizados no tratamento de proteínas e polímeros sintéticos ou são componentes de amaciantes de roupas e condicionadores de cabelo. Surfactantes anfotéricos também contêm cadeias longas de hidrocarbono e são tipicamente utilizados em xampus. Surfactantes não iônicos são geralmente utilizados em produtos de limpeza.

O termo "sintase" se refere a uma enzima que catalisa um

processo de síntese. Como utilizado aqui, o termo "sintase" inclui sintases e sintetases.

O termo "propriedade alvo" se refere a uma propriedade do gene inicial que é intuito ser alterada.

O termo "tioesterase" se refere a uma enzima que apresenta atividade de tioesterase. Tioesterases incluem tioéster hidrolases, que são identificadas como membros da Enzyme Classification E.C. 3.1.2 e são obtidas a partir de uma variedade de fontes. Tioesterases vegetais são descritas em, por exemplo, *Voelker* e *Davies*, J. Bact., Vol., 176, Nº. 23, pág. 7320-27, 1994, U.S. Patent No. 5.667.997, e U.S. Patent No. 5.455.167. Tioesterases são também capazes de ser obtidas a partir de fontes microbianas, tais como aquelas descritas em *Akoh et al.*, Prog. Lipid Res., vol. 43, nº. 6, pág. 534-52, 2004; *Diczfalusy* e *Alexson*, Arch. Biochem. Biophys., vol. 334, nº. 1, pág. 104-12, 1996; *Larson* e *Kolattukudy*, Arch. Biochem. Biophys., vol. 237, nº. 1, pág. 27-37, 1985; *Lawson et al.*, Biochemistry, vol. 33, nº. 32, pág. 9382-88, 1994; *Lee et al.*, Eur. J. Biochem., vol. 184, nº. 1, pág. 21-28, 1989; *Naggert et al.*, J. Biol. Chem., vol. 266, nº. 17, pág. 11044-50, 1991; *Nie et al.*, Biochemistry, vol. 47, nº. 29, pág. 7744-51, 2008; *Seay* e *Lueking*, Biochemistry, vol. 25, nº. 9, pág. 2480-85, 1986; *Spencer et al.*, J. Biol. Chem., vol. 253, nº. 17, pág. 5922-26, 1978; e *Zhuang et al.*, Biochemistry, vol. 47, nº. 9, pág. 2789-96, 2008. Tioesterases são também capazes de ser obtidas a partir de, por exemplo, fontes de cianobactéria, algas, mamíferos, insetos e fungos. Uma tioesterase pode apresentar atividade diferente da atividade de tioesterase, por exemplo atividade proteolítica ou

atividade de hidrólise de éster de oxigênio. Uma tioesterase particularmente útil é a enzima 'TesA (ou tioesterase I) de *E. coli*, que é uma versão truncada da enzima tioesterase serina TesA completa que é descrita em *Cho* e *Cronan*, J. Biol. Chem., vol., 268, nº. 13, pág. 9238-45, 1992. Um polipeptídeo 'TesA de *E. coli* contém 182 aminoácidos, e é o produto de uma reação de clivagem caracterizado pelo fato da sequência líder de aminoácidos de TesA de *E. coli* ser removida. A 'TesA de *E. coli*, por exemplo, apresenta a sequência de aminoácido de SEQ ID NO:31.

O termo "atividade de tioesterase" se refere à capacidade de catalisar uma reação de clivagem de tioéster, que geralmente envolve a hidrólise de um tioéster em um ácido e um tiol no grupamento tiol, porém pode também incluir uma etapa de transesterificação na qual a ligação tioéster é clivada e uma nova ligação éster é formada. Em geral, uma acil-ACP tioesterase é capaz de catalisar a clivagem hidrolítica de tioésteres de proteínas carreadoras acil-acil graxo e/ou tioésteres de acil-coenzima A graxo. Exemplos de enzimas apresentando atividade de tioesterase incluem acetil-CoA hidrolase, palmitoil-CoA hidrolase, sucinil-CoA hidrolase, formil-CoA hidrolase, acil-CoA hidrolase, palmitoil-proteína tioesterase, e ubiquitina tioesterase. Atividade de tioesterase pode ser estabelecida através de qualquer um dos seguintes ensaios:

Ensaio de Hidrólise de Acil-CoA:

Um tampão Tris-HCl, 0,1 M, pH 8,0; Palmitoil-CoA, 5 µM; DTNB, 0,01 M em 0,1 M de tampão de fosfato de potássio, pH 7,0 são utilizados para preparar uma mistura de ensaio completa. A mistura de ensaio então contém uma concentração final de 10 µmol

de tampão Tris-HCl, pH 8,0, 0,05 µmol de DTNB, e 0,01 µmol de palmitoil-CoA. A mistura de ensaio completa é então misturada com a tioesterase, em um volume final de 2,0 mL.

A taxa de clivagem do substrato de acil-CoA é medida através de monitoramento da alteração na absorbância a 405 nm, utilizando um coeficiente de extinção molar de 13.600 $M^{-1}cm^{-1}$.

Ensaio *In vivo*:

A tioesterase de interesse é expressa em um hospedeiro apropriado, tal como uma *E. coli*. Seguindo a expressão da proteína, a cultura é acidificada com 1 N de HCl a um pH final de por volta de 2,5 e então extraída com um volume igual de acetato de etila. Ácidos graxos livres na fase orgânica são derivatizados com hidróxido de tetrametilamônia (TMAH) para gerar os respectivos metil ésteres, que são então analisados em um equipamento de cromatografia a gás com um detector de ionização de chama.

Ensaio de Hidrólise de Tiolactona:

Uma solução de reagente contendo 25 mM de L-homocisteína tiolactona (L-HcyT) e 0,5 mM de 5,5-ditio-bis-2-ácido nitrobenzóico (DTNB) em 0,1 M de tampão HEPES (pH 7,3) é primeiramente preparada. Enzima é então adicionada à solução de reagente e hidrólise de L-HcyT é monitorada através de detecção do grupamento tiol livre com DTNB a 412 nm (ε = 13.600 $M^{-1}cm^{-1}$ para 5-tio-2-ácido nitrobenzóico).

Ensaio 4-MU-6S-Palm-βGlc:

Uma mistura de reação contendo 10 µL de enzima tioesterase e 20 µL de solução de substrato é primeiro preparada. A solução de substrato continha 0,64 mM de MU-6S-Palm-β-Glc, 15 mM de ditiotreitol (DTT), 0,375% (w/v) de Triton X-100, e 0,1 U de β-glucosidase de amêndoas em tampão fosfato/citrato de McIlvain, pH 4,0. A mistura de reação é incubada por 1 hora a 37°C. β-glucosidase exógena de amêndoa é adicionada para hidrolisar o intermediário de reação, MU-6-tio-β-glucosídeo, quantitativamente. A reação de hidrólise é terminada através da adição de 200 µL de carbonato de sódio 0,5 M, pH 10,7, contendo 0,025% de Triton X-100, e a fluorescência da metilumbeliferona (MU) liberada é medida em um fluorômetro (λ_{ex} = 372, λ_{em} = 445 nm).

Ensaio de Lisofosfolipase:

Uma mistura de reação contendo 10 µL de tioesterase misturada com 10 µL de 1-oleoil-fosfatidiletanolamina 3 mM, 25 µL de Tris-HCl 100 mM (pH 7,0), e 5 µL de EDTA 5 mM é preparada. A reação é terminada com a adição de 1,5 mL de $CHCl_3$:CH_3OH (1:2), seguido pela adição de água para trazer o volume aquoso total para 0,9 mL. A fase orgânica é então analisada através de fina camada de cromatografia com padrões apropriados, utilizando placas preparadas a partir de 40 g de Sílica Gel H suspendida em 95 mL de tetraborato de sódio 1 mM. O sistema de solvente consiste de $CHCl_3$:CH_3OH:H_2O (95:35:5).

Ensaio de Substrato de Protease:

Uma mistura de reação contendo 10 µL de enzima misturada com 800 µL de Tris-HCl 12,5 mM (pH 8,0) contendo Triton X-100

0,25% e 10 µL de Cbz-Phe-ONp dissolvido em DMSO é preparado. O p-nitrofenol liberado *via* clivagem do substrato é medido através de monitoramento da absorbância a 405 nm.

Ensaio de Hidrólise de Acil-PNP Graxo:

Uma solução de reagente contendo Triton X-100 2% em fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0, e C_{12}-p-nitrofenol (acil-PNP) 10 mM em acetona é primeiramente preparada. Então uma solução de trabalho de C_{12}-PNP é preparado através de mistura de 600 µL de C_{12}-PNP 10 mM em 9,4-mL de tampão fosfato.

O ensaio é desempenhado através da adição de 40 µL da solução de trabalho de acil-PNP em cada poço de uma placa de 96 poços, seguido da rápida adição de 40 µL de enzima. A solução é misturada por 15 segundos, e a alteração de absorbância é lida a 405 nm em um leitor de placa de microtitulação a 25°C.

Formação de Éster a partir de Tioéster:

Uma mistura de reação contendo 1,5 µM de enzima tioesterase, 100 µM de miristoil-CoA, metanol 10% (v/v), e fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0 é preparado. A mistura de reação é incubada por 1 hora a 20°C e terminada com a adição de HCl 1 N para baixar o pH para por volta de 2,5. A mistura é extraída com um volume igual de acetato de etila e a quantidade de éster graxo produzido é determinado *via* GC-MS ou outros métodos padrão tais como GC-FID, LC-MS, ou cromatografia de camada fina.

Formação de Ester a partir de Éster:

Uma mistura de reação contendo 1,5 µM de enzima tioesterase,

300 µM de lauroil-CoA, metanol 10% (v/v), e fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0 é preparado. A mistura de reação é incubada por 1 hora a 20°C e terminada com a adição de HCl 1 N para baixar o pH para por volta de 2,5. A mistura é extraída com um volume igual de acetato de etila e a quantidade de lauril éster produzido é determinado *via* GC-MS ou outros métodos padrão tais como GC-FID, LC-MS, ou cromatografia de camada fina.

O termo célula "transformada" ou "estavelmente transformada" se refere a uma célula que apresenta uma sequência polinucleotídica não nativa (heteróloga) integrada no seu genoma ou como um plasmídeo episssomal que é mantido por pelo menos duas gerações.

O termo "proteína de transporte" se refere a uma proteína que facilita o movimento de um ou mais compostos para dentro e/ou fora de um organismo ou organela. Em algumas concretizações, uma sequência de DNA exógena codificando uma proteína de transporte ATP-Binding Cassette (ABC) irá ser funcionalmente expressa pelo hospedeiro de produção de modo que o hospedeiro de produção exporta o derivado de ácido graxo no meio de cultura. Proteínas de transporte ABC são encontradas em muitos organismos, tais como *Caenorhabditis elegans*, *Arabidopsis thaliana*, *Alcaligenes eutrophus* (mais tarde renomeada *Ralstonia eutropha*), ou *Rhodococcus erythropolis*. Exemplos não limitantes de proteínas de transporte ABC incluem CER5, AtMRP5, AmiS2 e AtPGP1. Em uma concretização preferencial, a proteína de transporte ABC é CER5 (*ex.*, AY734542). Em outras concretizações, a proteína de transporte é uma proteína de efluxo selecionada dentre: AcrAB, TolC, ou AcrEF de *E. coli* ou tll1618, tll1619,

e tll0139 de *Thermosynechococcus elongatus BP-1*. Em concretizações adicionais, a proteína de transporte é uma proteína de transporte de ácido graxo (FATP) selecionado de *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Mycobacterium tuberculosis*, ou *Saccharomyces cerevisiae* ou qualquer uma das FATPs de mamífero conhecidas na arte. Proteínas de transporte são úteis, por exemplo, no aumento da secreção ou liberação de produtos que não são de outro modo capazes de secretar espontaneamente o produto. Elas são também úteis quando as células hospedeiras engenheiradas são capazes de secretar ou liberar espontaneamente o produto, porém ou a liberação é lenta ou incompleta. Sob aquelas circunstâncias, as proteínas de transporte podem aumentar a secreção através de aceleração da etapa de secreção ou direcionando a secreção até ser completada.

"Variante" é utilizado intercambiavelmente aqui com "mutante".

"Vetor" se refere a uma construção polinucleotídica desenhada para introduzir polinucleotídeos em um ou mais tipos celulares. Vetores incluem vetores de clonagem, vetores de expressão, vetores de trânsito, plasmídeos, cassetes e similares. Em algumas concretizações, a construção polinucleotídica contém uma sequência polinucleotídica codificando uma tioesterase (*ex.*, uma tioesterase precursora ou madura) que está operacionalmente ligada a uma pró-sequência apropriada (*ex.*, uma pró-sequência secretória) capaz de efetuar a expressão do polinucleotídeo ou gene em um hospedeiro apropriado.

Uma "cera" é uma substância contendo, pelo menos em parte,

ésteres graxos. Em certas concretizações, um éster graxo apresenta um lado A e um lado B, cada contendo cadeias de carbono de média a longa. Em adição a ésteres graxos, uma cera pode conter outros componentes. Por exemplo, uma cera pode conter hidrocarbonos, ésteres esteróis, aldeídos alifáticos, alcoóis, cetonas, beta-dicetonas, triacilgliceróis e similares. Tipicamente uma cera é um sólido a temperatura ambiente, por exemplo, a 20°C.

"Selvagem" significa, no contexto de gene ou proteína, uma sequência polinucleotídica ou protéica que ocorre na natureza. Em algumas concretizações, a sequência selvagem se refere a uma sequência de interesse que é um ponto de início para engenharia protéica.

Produção de Derivados de Ácido Graxo

De acordo com uma concretização da presente invenção, as tioesterases inéditas da invenção são expressas em uma célula hospedeira que é capaz de converter uma fonte de carbono em um derivado de ácido graxo. A invenção pertence a duas concretizações distintas: (1) a descoberta de que uma tioesterase mutante pode ser utilizada para otimizar e/ou desenhar uma composição de derivado de ácido graxo de modo a tornar tais composições mais úteis e que mutações diferentes irão prover diferentes propriedades alvo; e (2) a descoberta de que a tioesterase irá agir em uma célula hospedeira recombinante para diretamente produzir produtos de ésteres graxos, sem a presença de uma enzima sintase de cera ou éster sintase.

De acordo com uma concretização da invenção, as composições

de derivados de ácido graxo produzidos de acordo com os métodos, vetores, e células daqui apresentando propriedades modificadas ou alteradas quando comparado com os derivados de ácido graxo produzidos utilizando células hospedeiras que não contém as variantes de tioesterase da invenção. Por exemplo, como também descrito aqui, utilizando-se as tioesterases da presente invenção, é possível desenvolver processos de manufatura que produzem derivados de ácido graxo, que, em comparação com um processo similar envolvendo uma tioesterase selvagem, apresenta perfil de composição alterados, por exemplo, porcentagem alteradas de uma variação de ou um grupamento acil de comprimento de cadeia de carbono específico, grupamentos acil saturados ou insaturados, posição de insaturações, grupamentos acil ramificados, posição de ramificação, grupamentos hidroxil-acil, grupamentos ceto-acil, proporção de ésteres ou ácidos graxos livres no produto, proporção de derivados de ácido graxo de cadeia curta (*ex.*, C_8, C_9, C_{10}, C_{11}, C_{12}, C_{13}, e/ou C_{14}) X cadeia longa (*ex.*, C_{15}, C_{16}, C_{17}, C_{18}, C_{19}, e/ou C_{20}), ou produção de derivados de ácido graxo. De acordo, produtos com várias propriedades desejadas podem ser engenheiradas de modo que eles apresentem otimização de números de cetano, taxas de octanagem, estabilidade oxidativa, lubricidade, pontos de inflamação, viscosidade, pontos de ebulição, pontos de derretimento, pontos de derramamento, pontos de turvação, pontos de entupimento de filtro a frio, características de fluxo a frio, aromaticidade, e/ou números de iodo.

Derivados de ácido graxo são úteis como, ou como componentes de, biocombustíveis e químicos especiais. Derivados de ácido graxo e produtos feitos a partir deles incluem combustíveis,

aditivos de combustíveis, mistura de combustíveis, detergentes e surfactantes, suplementos nutricionais, polímeros, substituintes de parafina, lubrificantes, solventes, produtos de higiene pessoal, aditivos de processamento de borracha, inibidores de corrosão, emulsificantes, plásticos, tecidos, cosméticos, produtos de papel, coberturas, fluídos para produtos metálicos, dielétricos, agentes de lubrificação, e emolientes. Os métodos e composições revelados aqui permitem a produção de derivados de ácido graxo com pontos de ramificação, níveis de saturação, e comprimento de cadeia de carbono particulares. Os métodos e composições daqui também permitem a produção de uma proporção mais alta de ésteres graxos X outros produtos, ou alternativamente, uma proporção mais baixa de ésteres graxos X outros produtos, dependendo se uma produtividade proporcional ou de porcentagem mais alta de ésteres graxos ou uma produtividade proporcional ou de porcentagem mais baixa de ésteres graxos é desejada. Especificamente, por exemplo, os métodos e composições daqui permitem a produção de uma maior proporção de ésteres de ácido graxo X ácidos graxos livres, ou em outras palavras, permitem uma produtividade proporcional ou de porcentagem maior de ésteres de ácido graxo X ácidos graxos livres. Alternativamente, por exemplo, os métodos e composições daqui permitem a produção de uma menor proporção de ésteres de ácido graxo X ácidos graxos livres, quando grandes quantidades de ésteres de ácido graxo são desejadas. Além disso, os métodos e composições daqui permitem a produção de uma produtividade melhorada de derivados de ácido graxo.

Exemplos não limitantes de microorganismos que podem ser utilizados como hospedeiros de produção para produzir derivados

de ácido graxo incluem cianobactérias, algas, bactérias, leveduras ou fungos filamentosos. Exemplos adicionais não limitantes de hospedeiros de produção apropriados incluem células vegetais, animais e humanas.

Alcoóis (cadeia curta, cadeia longa, ramificado, ou insaturado) podem ser produzidos através de hospedeiros de produção descritos aqui. Tais alcoóis podem ser utilizados como combustível diretamente ou eles podem ser utilizados para criar um éster graxo. Ésteres graxos, sozinhos ou em combinação com outros derivados de ácido graxo descritos aqui, são também úteis como, ou como componentes de, combustíveis.

Similarmente, hidrocarbonos produzidos a partir de hospedeiros de produção descritos aqui podem ser utilizados como, ou como componentes de, biocombustíveis. Tais combustíveis baseados em hidrocarbono podem ser desenhados para conter pontos de ramificação, graus definidos de saturação, e comprimentos específicos de carbono utilizando os ensinamentos providos aqui. Quando utilizados como biocombustíveis sozinho ou em combinação com outros derivados de ácido graxo, os hidrocarbonos podem ser combinados com aditivos apropriados ou outros combustíveis tradicionais (*ex.*, alcoóis, diesel derivado de triglicerídeos, e combustíveis baseados em petróleo).

O número de cetano (CN), viscosidade, ponto de derretimento, e aquecimento de combustão para vários ésteres graxos foram caracterizados em *Knothe,* Fuel Processing Technology 86:1059-1070, 2005, que está incorporado aqui por referência na sua íntegra. Um hospedeiro de produção pode ser engenheirado para produzir qualquer um dos ésteres graxos descritos em *Knothe*,

utilizando os ensinamentos providos aqui.

Produção de Derivados de Ácido Graxo e Modificações para Melhoramento de Produção/Produtividade

O hospedeiro de produção utilizado para produzir acil-CoA e/ou derivados de ácido graxo pode ser recombinantemente modificado para incluir sequências polinucleotídicas que super-expressam peptídeos. Por exemplo, o hospedeiro de produção pode ser modificado para aumentar a produção de acil-CoA e reduzir o catabolismo de derivados de ácido graxo e intermediários na via biossintética de ácido graxo, ou para reduzir inibição autógena em pontos específicos na via biossintética de ácido graxo. Em adição à modificação de genes descritos aqui, recursos celulares adicionais podem ser desviados para super-produzir ácidos graxos. Por exemplo, as vias de lactato, sucinato, e/ou acetato podem ser atenuadas, e acetil-CoA carboxilase (*acc*) pode ser super-expressa. As modificações no hospedeiro de produção descritas aqui podem ser através de alterações genômicas, adição de sistemas de expressão recombinantes, ou combinações destas. Por exemplo, uma ou mais tioesterases endógenas de um hospedeiro de produção particular podem ser modificadas utilizando-se técnicas apropriadas de modo que o tioéster mutante apresenta pelo menos uma propriedade alterada quando comparada ao precursor endógeno de tioesterase, ou de modo que a célula hospedeira exiba pelo menos uma propriedade alterada, quando comparado à mesma célula hospedeira antes dela ser submetida às etapas de alteração genômica.

As vias biossintéticas de ácido graxo envolvidas estão ilustradas nas **FIGs. 2-5.** Subseções A-G abaixo descrevem as

etapas nessas vias. Várias enzimas catalisam várias etapas na via. De acordo, cada etapa é um lugar potencial para super-expressão do gene para produzir mais enzima(s) e então direcionar a produção de mais ácidos graxos e derivados de ácidos graxos. Genes codificando as enzimas requeridas para a via podem também ser recombinantemente adicionados a um hospedeiro de produção que não possui tais enzimas. Finalmente, etapas que poderiam competir com a via levando à produção de ácidos graxos e derivados de ácido graxo podem ser atenuados ou bloqueados com o intuito de aumentar a produção dos produtos desejados.

De acordo com as revelações daqui, um pessoa com habilidade básica na arte pode utilizar as tioesterases da invenção para preparar microorganismos que produzem derivados de ácido graxo e para manufaturar vários derivados de ácido graxo utilizando tais microorganismos, caracterizado pelo fato de tais derivados de ácido graxo apresentam propriedades alteradas. É adicionalmente possível preparar microorganismos que produzam tais derivados de ácido graxo mais eficientemente através da presença de níveis desejados de produtividade, ou titulação durante fermentações.

A. <u>Acetil-CoA - Malonil-CoA para Acil-ACP</u>

Ácido graxo sintase (FAS) é um grupo de peptídeos que catalisam a iniciação e elongação de cadeias acil (*Marrakchi et al.*, Biochemical Society, 30:1050-1055, 2002). A proteína carreadora acil (ACP) juntamente com as enzimas na via FAZ controlam o comprimento, grau de saturação, e ramificação dos ácidos graxos produzidos. As etapas nessa via são catalisadas por enzimas das famílias gênicas da biossíntese de ácido graxo

(*fab*) e acetil-CoA carboxilase (*acc*). Dependendo do produto desejado, um ou mais desses genes podem ser atenuados ou super-expressos.

I. Via biossintética de ácido graxo: acetil-CoA ou malonil-CoA para acil-ACP

A via biossintética de ácido graxo no hospedeiro de produção utiliza os acetil-CoA e malonil-CoA precursores. As etapas nessa via são catalisadas por enzimas das famílias gênicas da biossíntese de ácido graxo (*fab*) e acetil-CoA carboxilase (*acc*). Essa via é descrita em *Heath et al.*, Prog. Lipid Res., 40(6):467-97, 2001, que está incorporado aqui por referência.

Acetil-CoA é carboxilada pela acetil-CoA carboxilase (Acc, uma enzima com múltiplas subunidades codificadas por quatro genes em separado, *accABCD*) para formar malonil-CoA. O grupamento malonato é transferido para ACP pela malonil-CoA:ACP transacilase (FabD) para formar malonil-ACP. Uma reação de condensação então ocorre, onde malonil-ACP fusiona com acetil-CoA, resultando em β-cetoacil-ACP. β-cetoacil-ACP sintase III (FabH) inicia o ciclo Faz, enquanto β-cetoacil-ACP sintase I (FabB) e β-cetoacil-ACP sintase II (FabF) estão envolvidos em ciclos subsequentes.

Depois, um ciclo de etapas é repetido até que um ácido graxo saturado do comprimento apropriado seja feito. Primeiramente, a β-cetoacil-ACP é reduzida pela NADPH para formar β-hidróxiacil-ACP. Essa etapa é catalisada pela β-cetoacil-ACP redutase (FabG). β-hidróxiacil-ACP é então desidratada para formar *trans*-2-enoil-ACP. β-hidróxiacil-ACP desidratase/isomerase (FabA) ou

β-hidróxiacil-ACP desidratase (FabZ) catalisam essa etapa. NADPH-dependente *trans*-2-enoil-ACP redutase I, II, ou III (FabI, FabK, ou FabL, respectivamente) reduz *trans*-2-enoil-ACP para formar acil-ACP. Ciclos subsequentes são iniciados através da condensação de malonil-ACP com acil-ACP pela β-cetoacil-ACP sintase I ou β-cetoacil-ACP sintase II (FabB ou FabF, respectivamente).

II. Modificação da via biossintética de ácido graxo para aumentar a produção de acil-ACP

Organismos hospedeiros de produção podem ser engenheirados para super-produzir acetil-Coa e malonil-CoA. Tais organismos hospedeiros de produção incluem células vegetais, animais e humanas. Microorganismos tais como cianobactérias, algas, bactérias, leveduras, ou fungos filamentosos podem ser utilizados como hospedeiros de produção. Exemplos não limitantes de microorganismos que podem ser utilizados como hospedeiros de produção incluem *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida lipolytica*, *Synechococcus*, *Synechocystis*, *Clamydomonas*, *Arthrobacter AK 19*, *Rhodotorula glutinins*, *Acinetobacter sp.* cepa *M-1*, *Candida lipolytica*, e outros microoganismos oleaginosos. Várias modificações diferentes podem ser feitas, tanto em combinação quanto individualmente, no hospedeiro de produção para obter produção aumentada de acetil-CoA/malonil-CoA/ácido graxo e derivado de ácido graxo.

Por exemplo, para aumentar a produção de acetil-CoA, um ou mais dos seguintes genes podem ser expressos em um hospedeiros de produção: *pdh*, *panK*, *aceEF* (que codifica os complexos do componente E1p desidrogenase e do componente E2p

dihidrolipoamida aciltransferase do piruvato e da 2-oxoglutarato desidrogenase), *fabH, fabD, fabG, acpP,* e *fabF*. Em outros exemplos, genes adicionais codificando acil-CoA graxo redutases e aldeído decarbonilases podem ser expressas no hospedeiro de produção. É conhecido na arte que um plasmídeo contendo um ou mais dos genes previamente mencionados, todos sob o controle de um promotor constitutivo, ou de outro modo controlável, pode ser construído. Números de Acesso do GenBank exemplares para esses genes são listados nos parênteses: *pdh* (BAB34380, AAC73227, AAC73226), *panK* (também conhecido como *coaA*, AAC76952), *aceEF* (AAC73227, AAC73226), *fabH* (AAC74175), *fabD* (AAC74176), *fabG* (AAC74177), *acpP* (AAC74178), e *fabF* (AAC74179).

Adicionalmente, os níveis de expressão de *fadE, gpsA, ldhA, pflb, adhE, pta, poxB, ackA,* e/ou *ackB* podem ser atenuados ou eliminados no microorganismo engenheirado através da transformação com plasmídeos condicionalmente replicativos ou não replicativos contendo mutações nelas ou de deleção dos genes correspondentes, ou através da substituição de sequências promotores e de intensificadores. Números de Acesso do GenBank exemplares para esses genes são listados nos parênteses: *fadE* (AAC73325), *gspA* (AAC76632), *ldhA* (AAC74462), *pflb* (AAC73989), *adhE* (AAC74323), *pta* (AAC75357), *poxB* (AAC73958), *ackA* (AAC75356), e *ackB* (BAB81430). Os hospedeiros de produção engenheirados apresentam níveis de produção aumentados de acetil-CoA quando crescidos em um ambiente apropriado.

Além disso, a superprodução de malonil-CoA pode ser afetada pelo engenheiramento do hospedeiro de produção como descrito

acima com *accABCD* (*ex.*, Número de Acesso do GenBank AAC73296, EC 6.4.1.2) incluído no plasmídeo sintetizado *de novo*. Superprodução de ácido graxo pode ser alcançada através da inclusão adicional de um gene codificando lipase (*ex.*, Números de Acesso do GenBank CAA89087 e CAA98876) no plasmídeo sintetizados *de novo*.

Como um resultado, em alguns exemplos, uma acetil-CoA carboxilase é super-expressa para aumentar a concentração intracelular destes em pelo menos por volta de 2 vezes, pelo menos por volta de 5 vezes, ou pelo menos por volta de 10 vezes, relativo aos níveis de expressão nativa.

Em adição, um mutante PlsB (*ex.*, Número de Acesso do GenBank AAC77011) D311E pode ser utilizado para aumentar a quantidade de acil-CoA disponível.

Em adição, super-expressão de um gene *sfa* (supressor de FabA, *ex.*, Número de Acesso do GenBank AAN79592) pode ser incluído no hospedeiro de produção para aumentar a produção de ácidos graxos monoinsaturados (*Rock et al.*, J. Bacteriology, 178:5382-5387, 1996).

B. <u>Acil-ACP e/ou Acil-CoA para Éster Graxo Utilizando Tioesterase</u>

Em um modelo de processo microbiano típico para síntese de ácido graxo, acetil-CoA e malonil-CoA são convertidos através de uma série de etapas para formar as cadeias acil-ACP. Acil-ACP é então convertido *via* uma série de etapas enzimáticas alternativas para vários produtos finais, incluindo derivados de

ácido graxo. Por exemplo, tipicamente acil-ACP é convertido a ésteres graxo através de reações consecutivas combinadas de uma tioesterase, uma acil-CoA ligase/sintetase e um éster sintase. Uma limitação ao uso comercial dessas enzimas em uma via metabólica é a necessidade de produzir o substrato acil-CoA graxo a partir de um precursor de acil ACP graxo, que requer pelo menos duas etapas enzimáticas e o gasto de energia metabólica a partir de duas ligações fosfoanidrido. Uma produção direta de ésteres graxos com tioesterase mitiga a perda de ATP causada por essas duas etapas enzimáticas. Recentemente foi demonstrado que lípases (cujo substrato de "álcool" natural é água) pode também ser utilizado *in vitro* para catalisar a reação de transesterificação que faz o biodiesel (*i.e.* a conversão do triacil glicerídeo e metanol em etil éster de ácido graxo e glicerol). Porém, lípases são geralmente tóxicas às células quando produzidas intracelularmente.

Apesar de apresentar uma especificidade publicada pela água, a presente invenção descreve a descoberta que, na presença de uma quantidade suficiente de um álcool, o álcool pode se tornar um substrato aceitável para uma tioesterase. Naquele caso, tioesterases podem catalisar a alcólise dos intermediários de enzima de acil graxo, igualmente como a lípase faz *in vitro*. Logo, sob as condições certas, uma enzima que aceita um éster graxo como substrato para formar um intermediário de enzima graxa que é subsequentemente clivado através tanto de hidrólise quanto de transesterificação pode ser utilizada para sintetizar ésteres de ácido graxo desejados se um nível suficiente de um álcool apropriado for provido para direcionar alcólise. Exemplos de enzimas apresentando essa capacidade, que podem produzir ésteres

diretamente a partir de acil-ACP inclui, em adição a tioesterases, aciltransferases, lípases, esterases, e proteases. Tioesterases úteis podem ser tioesterases precursoras e/ou que ocorrem na natureza como definida aqui, ou que podem ser tioesterases mutantes preparadas de acordo com as revelações daqui. Alguém com habilidade básica na arte é capaz de determinar a conveniência de uso de uma enzima particular para diretamente produzir ésteres graxos a partir de Acil-ACP. Por exemplo, os ensaios providos no Exemplo 32 são úteis na determinação da produção de éster direta.

De acordo com esse aspecto da invenção, a tioesterase pode ser utilizada para produzir diretamente ésteres graxos tanto na presença ou na ausência de uma éster sintase e/ou uma acil CoA graxa ligase/sintetase. Por exemplo, expressão de uma tioesterase que pode catalisar a produção direta de ésteres graxos em uma cepa de hospedeiro recombinante pode ser utilizada no suplemento da produção de éster graxo onde a cepa também expressa uma éster sintase. Adicionalmente, expressão de uma tioesterase que pode catalisar a produção direta de ésteres graxos em uma célula de hospedeiro recombinante pode ser utilizada onde não existe ou existe baixa expressão da éster sintase.

Uma tioesterase mutante pode ser utilizada que foi modificada para apresentar propriedades alteradas comparadas à tioesterase precursora.

C. Acil-ACP para Ácido Graxo

I. Via biossintética de ácido graxo: acil-ACP para ácidos

graxos

Como descrito acima, acetil-CoA e malonil-CoA são processados em várias etapas para formar cadeias acil-ACP. A enzima *sn*-glicerol-3-fosfato aciltransferase (PlsB) catalisa a transferência de um grupamento acil a partir de acil-ACP ou acil-CoA para a posição *sn*-1 do glicerol-3-fosfato. Logo, PlsB é uma enzima reguladora chave na síntese de fosfolipídeo, que é uma parte da via de ácido graxo. A inibição de PlsB leva ao aumento nos níveis de acil-ACP de cadeia longa, cuja regulação autógena irá inibir etapas iniciais na via, que envolvem genes tais como, por exemplo, *accABCD, fabH*, e *fabI*. A desconexão dessa regulação, por exemplo através de super-expressão de tioesterase, leva ao aumento da produção de ácido graxo.

II. Modificação da via biossintética de ácido graxo para produzir os tipos ou proporções desejadas de ácidos graxos

De acordo com a invenção, a tioesterase expressa apresenta propriedades alteradas quando comparada à tioesterase nativa ou endógena na cepa hospedeira. Para engenheirar uma hospedeiro de produção para a produção de uma população homogênea de derivados de ácidos graxos, um ou mais genes endógenos podem ser atenuados ou funcionalmente deletados e, como um resultado, uma ou mais tioesterases de acordo com a invenção podem ser expressas. Por exemplo, derivados de ácido graxo C_{10} (*i.e.*, derivados de ácido graxa cada um contendo uma cadeia de carbono que possui 10 carbonos de comprimento) pode ser produzida através de tioesterase atenuada C_{18} (*ex.*, Números de Acesso do GenBank AAC73596 e P0ADA1), que utiliza $C_{18:1}$-ACP, e através da expressão de uma tioesterase alterada que apresenta especificidade para

e/ou atividade (*ex.*, taxa catalítica) aumentada no que diz respeito a substratos C_{10} (*i.e.*, substratos cada um contendo uma cadeia de carbono que tem 10 carbonos de comprimento). Esse resultado em uma população mais homogênea de derivados de ácido graxo que apresentam um aumento em ácidos graxos apresentando uma cadeia de carbono de comprimento de 10. Em outro exemplo, derivados de ácido graxo C_{12} podem ser produzidos através de atenuação de tioesterases endógenas que produzem ácidos graxos não C_{12} e expressam uma tioesterase alterada que apresenta uma especificidade por e/ou atividade (*i.e.*, taxa catalítica) aumentadas no que diz respeito a substratos C_{12}. Em outro exemplo, derivados de ácido graxo C_{14} podem ser produzidos através de atenuação de tioesterases endógenas que produzem ácidos graxos não C_{14} e expressam uma tioesterase alterada que apresenta uma especificidade por e/ou atividade (*i.e.*, taxa catalítica) aumentadas no que diz respeito a substratos C_{14}. Em outro exemplo, uma produtividade proporcional mais alta de derivados de ácido graxo de cadeia curta (*ex.*, C_8, C_9, C_{10}, C_{11}, C_{12}, C_{13}, e/ou C_{14}) X outros derivados de ácido graxo de cadeias não curtas na mistura de produto. Em ainda outro exemplos, uma produtividade proporcional mais baixa de derivados de ácido graxo de cadeia curta (*ex.*, C_8, C_9, C_{10}, C_{11}, C_{12}, C_{13}, e/ou C_{14}) X outros derivados de ácido graxo de cadeias não curtas na mistura de produto também pode ser atingida. Em um exemplo adicional, uma produtividade maior e/ou melhorada de derivados de ácido graxo livre pode ser produzida através da expressão de uma tioesterase alterada que apresenta taxa catalítica e/ou produção ou produtividade melhoradas *in vivo*. Em ainda outro exemplo, uma produtividade proporcional ou de porcentagem maior ou menor de ésteres graxos

X outros produtos, tais como ácidos graxos livres, pode ser produzida através da aplicação de uma ou mais de certas tioesterases mutantes. A superprodução de acetil-CoA, malonil-CoA, e ácido graxo pode ser verificada utilizando-se métodos conhecidos na arte, por exemplo através de precursores radioativos, HPLC, LC-MS, e GC-MS subsequente à lise celular.

Em uma concretização alternativa, uma tioesterase mutante da invenção pode ser expressa na cepa hospedeira em combinação com uma tioesterase endógena. Em ainda outra concretização alternativa, uma ou mais tioesterases endógenas podem ser modificadas utilizando técnicas apropriadas de alteração genômica que são conhecidas por aqueles versados na arte, de modo que tioesterases mutantes apresentam pelo menos uma propriedade alterada quando comparada aos precursores endógenos de tioesterases, e/ou de modo que a célula hospedeira exiba pelo menos uma propriedade alterada quando comparada com a célula hospedeira antes de tais técnicas de alteração genômica terem sido aplicadas.

D. Ácido Graxo para Acil-CoA

I. Conversão de ácidos graxos em acil-CoA

Acil-CoA sintase (ACS) esterifica ácidos graxos livres para acil-CoA através de um mecanismo de duas etapas. Esse ácido graxo livre primeiramente é convertido em um intermediário acil-AMP (um adenilato) através de pirofosforólise de ATP. O carbonil carbono ativado do adenilato é então acoplado ao grupamento tiol de CoA, liberando AMP e o produto final acil-CoA. *Veja Shockey et al.*, Plant Physiol. 129:1710-1722, 2002.

A enzima ACS FadD de *E. coli* e a proteína de transporte de ácido graxo FadL são tipicamente componentes importantes de um sistema de absorção de ácido graxo. FadL medeia o transporte de ácidos graxos na célula bacteriana, e FadD medeia a formação de ésteres acil-CoA. Quando nenhuma outra fonte de carbono está disponível, ácidos graxos exógenos são retirados pela bactéria e convertidos em ésteres acil-CoA, que se ligam ao fator de transcrição FadR e desrreprime a expressão dos genes *fad* que codificam as proteínas responsáveis pelo transporte (FadL), ativação (FadD), e β-oxidação (FadA, FadB, FadE, e FadH) de ácidos graxos. Quando fontes alternativas de carbono estão disponíveis, bactérias sintetizam ácidos graxos como acil-ACPs, que são então utilizados para síntese de fosfolipídeo, ao invés de servir como substrato para β-oxidação. Logo, acil-CoA e acil-ACP são fontes independentes de ácidos graxos que levam a produtos finais diferentes. *Veja Caviglia et al.*, J. Biol. Chem., 279(12):1163-1169, 2004.

II. Modificação da via biossintética de ácido graxo para aumentar a conversão de ácidos graxos em acil-CoA

Hospedeiros de produção podem ser engenheirados utilizando peptídeos conhecidos para produzir ácidos graxos de vários comprimentos que podem ser convertidos em acil-CoA. Um método de produção de derivados de ácido graxo envolve o aumento da expressão de, ou expressão de formas mais ativas de, um ou mais peptídeos de acil-CoA sintase (EC 6.2.1.-).

Uma lista de acil-CoA sintases que podem ser expressas para produzir acil-CoA e derivados de ácido graxo é mostrada na **Tabela 1.** Essas Acil-CoA sintases podem ser examinadas para otimizar

qualquer via que utiliza acil-CoAs graxos como substrato. Utilizando bioinformática e genes sintéticos, genes *fadD* heterólogos podem ser expressos nas cepas de produção e avaliados pela suas capacidades de produzir biodiesel e potencialmente "biocrude".

Tabela 1: Acil-CoA sintases

Nome do Gene/Lócus	Fonte	Nº de Acesso do GenBank	% de Identidade com FadD de *E. coli*	% de Similaridade com FadD de *E. coli*
fadD	*E. coli*	NP_416319	-	-
fadK	*E. coli*	YP_416216	28	46
fadD	*Acinetobacter sp. ADP1*	YP_045024	51	70
fadD	*Haemophilus influenza RdKW20*	NP_438551	64	78
BH3103	*Bacillus halodurans C-125*	NP_243969	40	58
yhfL	*Bacillus subtilis*	NP_388908	39	57
pfl-4354	*Pseudomonas fluorescens Pfo-1*	YP_350082	52	71
EAV15023	*Comamonas testosterone KF-1*	ZP_01520072	55	72
fadD1	*Pseudomonas aeruginosa*	NP_251989	54	72
fadD2	*Pseudomonas aeruginosa PAO1*	NP_251990	55	72
fadD	*Rhizobium etli CFN42*	YP_533919	55	72
RPC_4074	*Rhodopseudomonas palustris Bis B18*	YP_533919	56	72
fadD1	*Rasltonia solanacearum GMI 1000*	NP_520978	56	72
fadDD35	*Mycobacterium tuberculosis H37Rv*	NP_217021	28	46
fadDD22	*Mycobacterium tuberculosis H37Rv*	NP_217464	23	42
PRK0059	*Stenotrophomonas maltophilia R551-3*	ZP_01644857	59	75

Baseado nos seus graus de similaridade com *fadD* de *E.coli*, os seguintes genes homólogos são selecionados para serem sintetizados e avaliados:

fadDD35 de *M. tuberculosis* HR7Rv [NP_217021].

yhfL de *B. subtilis* [NP_388908].

fadD1 de *P. aeruginosa* PAO1 [NP_251989].

Homólogo de *fadD*, codificando Faa3p de *Saccharomyces cerevisiae* [NP_012257].

Acil-CoA sintases de ácido graxo adicionais de organismos eucarióticos, que podem ser utilizados para produzir acil-CoA assim como derivados de ácido graxo, incluem aqueles descritos em *Shockey et al.*, Plant Physiol., 129: 1710-1722, 2002 (Arabidopsis), *Caviglia et al.*, J. Biol. Chem., 279: 1163-1169, 2004 (rato), e *Knoll et al.*, J. Biol. Chem., 269(23):16348-56, 1994 (levedura). Sequências gênicas codificando essas sintetases são conhecidas na arte. *Veja, ex., Johnson et al.*, J. Biol. Chem., 269: 18037-18046, 1994; *Shockey et al.*, Plant Physiol., 129: 1710-1722, 2002; *Black et al.*, J. Biol. Chem., 267: 25513-25520, 1992. Essas acil-CoA sintases eucarióticas, apesar de não possuírem alta homologia com sequências FadD de *E. coli*, podem complementar a atividade FadD em mutantes FadD nulos de *E. coli*.

A. Acil-CoA para Álcool Graxo

1. Conversão de acil-CoA para álcool graxo

Acil-CoA é reduzido a um aldeído graxo por uma NADH-dependente acil-CoA redutase (*ex.*, Acr1). O aldeído graxo é então reduzido a um álcool graxo por uma NADPH-dependente álcool desidrogenase (*ex.*, YqhD). Alternativamente, álcool graxo formador de acil-CoA redutase (FAR) catalisa a redução de uma

acil-CoA em um álcool graxo e CoASH. FAR utiliza NADH ou NADPH como um cofator nessa redução de quatro elétrons. Apesar das reações de FAR geradoras de álcool procederem através de um aldeído intermediário, um aldeído livre não é liberado. Logo, os FARs formadores de álcool são distintos das enzimas que conduzem reduções de dois elétrons de acil-CoA e geram aldeído graxo livre como um produto. (*Veja Cheng* e *Russell*, J. Biol. Chem., 279(36):37789-37797, 2004; *Metz et al.*, Plant Physiol., 122:635-644, 2000).

2. Modificação de vias biossintéticas de ácido graxo para aumentar a conversão de acil-CoA para álcool graxo

Hospedeiros de produção podem ser engenheirados utilizando polipeptídeos conhecidos para produzir alcoóis graxos a partir de acil-CoA. Um método de obter alcoóis graxos envolve o aumento da expressão de, ou expressão de formas mais ativas de, acil-CoA redutase formadora de álcool graxo (codificado por um gene tal como *acr1*, EC 1.2.1.50/1.1.1), acil-CoA redutases (EC 1.2.1.50), e/ou álcool desidrogenases (EC 1.1.1.1).

Álcoois graxos são geralmente descritos como surfactantes baseados em hidrocarbonos. Eles também servem como componentes apropriados de surfactantes. Para produção de surfactante, o hospedeiro de produção é modificado de modo que ele produza um surfactante a partir de uma fonte renovável de carbono. Tal hospedeiro de produção inclui uma primeira sequência exógena codificando uma proteína capaz de converter um ácido graxo em um aldeído graxo e uma segunda sequência polinucleotídica exógena codificando uma proteína capaz de converter um aldeído graxo em um álcool. Em alguns exemplos, a primeira sequência

polinucleotídica exógena codifica uma redutase de ácido graxo. Em uma concretização, a segunda sequência polinucleotídica exógena codifica uma aldeído microssomal redutase de mamífero ou desidrogenase de aldeído de cadeia longa. Em um exemplo adicional, a primeira e segunda sequências polinucleotídicas exógenas são provenientes de *Arthrobacter AK 19*, *Rhodotorula glutinins*, *Acinetobacter sp.* cepa *M-1*, ou *Candida lipolytica.* Em uma concretização, a primeira e segunda sequências polinucleotídicas heterólogas formam um complexo multi-enzimático proveniente de *Acinetobacter sp.* cepa *M-1* ou proveniente de *Candida lipolytica*.

Fontes adicionais de sequências de DNA heterólogas codificando ácido graxo para proteínas convertoras de álcool de cadeia longa que podem ser utilizadas em produção de surfactante incluindo, porém não limitado a, *Mortierella alpina* (ATCC 32222), *Cryptococcus curvatus,* (também referido como *Apiotricum curvatum*), *Alcanivorax jadensis* (T9T =DSM 12718 =ATCC 700854), *Acinetobacter* sp. HO1-N (ATCC 14987) e *Rhodococcus opacus* (PD630 DSMZ 44193).

Em um exemplo, o derivado de ácido graxo é um produto surfactante saturado ou insaturado apresentando um comprimento de cadeia de carbono de por volta de 6 a por volta de 36 átomos de carbono, por volta de 8 a por volta de 30 átomos de carbono, por volta de 10 a por volta de 26 átomos de carbono, por volta de 12 a por volta de 20 átomos de carbono, ou por volta de 12 a por volta de 16 átomos de carbono. Em outro exemplo, o produto surfactante apresenta um comprimento de cadeia de carbono de por volta de 10 a por volta de 18 átomos de carbono, ou por volta de

12 a por volta de 14 átomos de carbono.

Hospedeiros de produção para produção de surfactantes incluem microorganismos eucarióticos ou procarióticos. Hospedeiros de produção exemplares incluem *Arthrobacter AK 19*, *Rhodotorula glutinins*, *Acinetobacter sp.* cepa *M-1*, *Arabidopsis thaliana*, *Candida lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae*, cianobactéria tais como *Synechocystis spp.* e *Synechococcus spp.*, Algas tal como *Clamydomonas*, e *E. coli* engenheirados para super-expressar acetil-CoA carboxilase. Hospedeiros de produção que demonstram uma habilidade inata para sintetizar altos níveis de precursores de surfactantes na forma de lipídeos e óleos, tais como *Rhodococcus opacus*, *Arthrobacter AK 19*, *Rhodotorula glutinins*, *E. coli* engenheirados a expressar acetil CoA carboxilase, e outras cianobactérias, bactérias, leveduras, e fungos oleaginosos podem também ser utilizados.

B. Alcoóis Graxos para Ésteres Graxos

Hospedeiros de produção podem ser engenheirados utilizando-se polipeptídeos conhecidos para produzir ésteres graxos de vários comprimentos. Um método de produção de ésteres graxos incluem aumento da expressão de, ou expressão de formas mais ativas de, um ou mais peptídeos de álcool *O*-acetiltransferase (EC 2.3.1.84). Esses peptídeos catalisam a acetilação de um álcool através da conversão de um acetil-CoA e um álcool em um CoA e um éster. Em alguns exemplos, os peptídeos álcool *O*-acetiltransferase podem ser expressos em conjunção com peptídeos tioesterase selecionados, peptídeos FAZ, e peptídeos formadores de álcool graxo, então permitindo o controle de comprimento de cadeia de carbono, níveis de saturação, e graus de ramificação.

Em alguns casos, o operon *bkd* pode ser co-expresso com o intuito de produzir precursores de ácido graxo ramificado.

Como utilizado aqui, peptídeos álcool *O*-acetiltransferase incluem peptídeos no número de classificação de enzimas EC 2.3.1.84, assim como qualquer outro peptídeo capaz de catalisar a conversão de um acetil-CoA e um álcool para formar um CoA e um éster. Adicionalmente, alguém de habilidade básica na arte irá apreciar que peptídeos álcool *O*-acetiltransferase podem também catalisar outras reações.

Por exemplo, alguns peptídeos álcool *O*-acetiltransferase podem aceitar outros substratos em adição a alcoóis graxos e/ou acetil-CoA tioésteres, tais como outros alcoóis e outros acil-CoA tioésteres. Tais peptídeos álcool *O*-acetiltransferase não específicos ou de especificidade divergente são, portanto, também inclusos. Várias sequências peptídicas álcool *O*-acetiltransferase estão disponíveis publicamente. Ensaios para medição da atividade de peptídeos álcool *O*-acetiltransferase são conhecidos na arte. Além disso, *O*-aciltransferases podem ser engenheiradas para registrar novas atividades e/ou especificidades para o grupamento doador acil ou a porção aceptora álcool. Enzimas engenheiradas podem ser geradas através de abordagens racionais e evolucionárias bem documentadas.

C. Acil-CoA para Ésteres Graxos

1. Produção de ésteres graxos

Ésteres graxos são sintetizados por uma acil-CoA:álcool graxo aciltransferase (*ex.*, éster sintase), que conjuga um

álcool graxo de cadeia longa com um acil-CoA graxo *via* uma ligação de éster. Éster sintases e os genes codificantes são conhecidos da planta jojoba e da bactéria *Acinetobacter sp.* cepa *ADP1* (antes conhecida como *Acinetobacter calcoaceticus ADP1*). A éster sintase bacteriana é uma enzima bifuncional, exibindo atividade éster sintase e a habilidade de formar triacilgliceróis a partir de substratos diacilglicerol e acil-CoAs graxos (atividade acil-CoA:diglicerol aciltransferase (DGAT)). O gene *wax/dgat* codifica tanto éster sintase quanto DGAT. *Veja Cheng et al.*, J. Biol. Chem., 279(36):37798-37807, 2004; *Kalscheuer* e *Steinbuchel*, J. Biol. Chem., 278:8075-8082, 2003. Éster sintases podem também ser utilizadas para produzir certos ésteres graxos que podem ser utilizados como um combustível, tal como biodiesel, como descrito aqui.

2. Modificação da via biossintética de ácido graxo para produzir ésteres graxos utilizando éster sintase

A produção de ésteres graxos, incluindo ceras, a partir de acil-CoA e alcoóis, pode ser engenheirada utilizando polipeptídeos conhecidos. Um método de produção de ésteres graxos incluem o aumento da expressão de, ou expressão de formas mais ativas de, uma ou mais éster sintases (EC 2.3.1.20, 2.3.1.75). Várias sequências peptídicas de éster sintase estão publicamente disponível. Métodos de determinação da atividade de éster sintase são providos em U.S. Patent No. 7.118.896, que é aqui incorporada por referência na sua íntegra.

Em certas concretizações, se o produto desejado é um biocombustível baseado em éster, um hospedeiro de produção pode ser modificado de modo que ele produza um éster a partir de uma

fonte de energia renovável. Tal hospedeiro de produção inclui genes exógenos codificando uma éster sintase que é expressa de modo a conferir ao dito hospedeiro de produção a habilidade de sintetizar um éster graxo saturado, insaturado, ou ramificado a partir de uma fonte de energia renovável. Em algumas concretizações, o organismo pode também expressar genes codificando as seguintes proteínas exemplares: elongases de ácido graxo, acil-CoA redutases, aciltransferases, éster sintases, acil graxo transferases, diacilglicerol aciltransferases, tioesterases, e/ou álcool de cera acil-CoA aciltransferases. Em uma concretização alternativa, o organismo expressa um gene codificando uma éster sintase/acil-CoA:diacilglicerol aciltransferase bifuncional. Por exemplo, a éster sintase/acil-CoA:diacilglicerol aciltransferase bifuncional pode ser selecionada a partir de complexos multi-enzimáticos provenientes de *Simmondsia chinensis*, *Acinetobacter sp.* cepa *ADP1* (antes conhecida como *Acinetobacter calcoaceticus ADP1*), *Alcanivorax borkumensis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Fundibacter jadensis*, *Arabidopsis thaliana*, ou *Alcaligenes eutrophus* (mais tarde renomeada *Ralstonia eutropha*). Em uma concretização, elongases de ácido graxo, acil-CoA redutases, ou cera sintases são obtidas e/ou derivadas a partir de um complexo multi-enzimático proveniente de *Alcaligenes eutrophus* (mais tarde renomeada *Ralstonia eutropha*) ou outros organismos conhecidos na literatura por produzir ésteres tais como ceras ou ésteres graxos.

Fontes adicionais de sequências de DNA heterólogas codificando proteínas de síntese de éster úteis na produção de éster graxo incluem, porém não são limitados a, *Mortierella*

alpina (ex., ATCC 32222), *Cryptococcus curvatus* (também referida como *Apiotricum curvatum*), *Alcanivorax jadensis* (ex., T9T =DSM 12718 =ATCC 700854), *Acinetobacter sp. HO1-N*, (ex., ATCC 14987) e *Rhodococcus opacus* (ex., PD630, DSMZ 44193).

Hospedeiros de produção úteis para produção de ésteres graxos podem ser microorganismos eucarióticos ou procarióticos. Exemplos não limitantes de hospedeiros de produção para produção de ésteres graxos incluem *Saccharomyces cerevisiae*, *Synechococcus*, *Synechocystis*, *Clamydomonas*, *Candida lipolytica*, *E. coli*, *Arthrobacter AK 19*, *Rhodotorula glutinins*, *Acinetobacter sp.* cepa *M-1*, *Candida lipolytica*, e outros microorganismos oleaginosos.

Em um exemplo, a éster sintase proveniente de *Acinetobacter sp. ADP1* no lócus AAO17391 (descrita em *Kalscheuer* e *Steinbuchel*, J. Biol. Chem., 278:8075-8082, 2003, incorporada aqui por referência) é utilizada. Em outro exemplo, a éster sintase proveniente de *Simmondsia chinensis* no lócus AAD38041 é utilizada.

Em certas concretizações, os ésteres produzidos de acordo com os métodos e composições daqui são secretados ou liberados das células hospedeiras, e então podem ser recuperados extracelularmente. Opcionalmente, um exportador de éster tal como um membro da família FATP pode ser utilizado para facilitar a liberação de ésteres para o ambiente extracelular. Um exemplo não limitante de um exportador de éster apropriado é proteína de transporte de ácido graxo (cadeia longa) CG7400-PA, isoforma A, proveniente de *Drosophila melanogaster*, no lócus NP_524723.

D. Acil-ACP, Acil-CoA para Hidrocarbono

1. Hidrocarbonos provenientes de microorganismos particulares

Um conjunto diverso de microorganismos é conhecido por produzir hidrocarbonos, tais como alcanos, olefinas, e isoprenóides. Muitos destes hidrocarbonos são derivados a partir da biossíntese de ácido graxo. A produção desses hidrocarbonos pode ser controlada através do controle dos genes associados com biossíntese de ácido graxo nos hospedeiros de produção nativos.

Por exemplo, a biossíntese de hidrocarbono na alga *Botryococcus braunii* ocorre *via* a decarbonilação de aldeídos graxos. Os aldeídos graxos são produzidos através da redução de tioésteres de acil graxo através de uma enzima tal como a acil-CoA graxo redutase. Logo, a estrutura dos alcanos finais podem ser controladas através do engenheiramento de *B. braunii* para expressar genes específicos, tal como tioesterases, que controlam o comprimento de cadeia de ácidos graxos sendo canalizados para a biossíntese de alcano. A expressão de enzimas que resultam na biossíntese de ácido graxo de cadeia ramificada em *B. braunii* irá resultar na produção de alcanos de cadeia ramificada. A introdução de genes que afetam a produção de ácidos graxos dessaturados irá resultar na produção de olefinas. Combinações adicionais desses genes podem prover controle adicional sobre a estrutura final dos hidrocarbonos que serão produzidos.

Para produzir altos níveis de hidrocarbonos nativos ou engenheirados, os genes envolvidos na biossíntese de ácidos

graxos e seus precursores, ou a degradação de outros produtos podem ser expressos, super-expressos, ou atenuados. Cada uma dessas abordagens podem ser aplicadas na produção de alcanos em *Vibrio furnissii* M1 e outras cepas de *Vibrio furnissii*, que produzem alcanos através da redução de alcoóis graxos. Em adição a *Vibrio furnissii*, outros organismos produtores de alcanos que utilizam a via de ácido graxo podem ser utilizados.

Cada uma dessas abordagens podem também ser aplicadas à produção das olefinas produzidas pelas cepas de *Micrococcus leuteus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, e microorganismos relacionados. Esses microorganismos produzem olefinas de cadeia longa que são derivadas a partir de condensação cabeça-cabeça de precursores de ácido graxo. O controle da estrutura e nível dos precursores de ácido graxo utilizando os métodos descritos aqui irá resultar na formação de olefinas de diferentes comprimentos de cadeia, características de ramificação, e níveis de saturação.

Cianobactérias podem também ser utilizadas como hospedeiros de produção apropriados para a produção de derivados de ácido graxo tais como alcoóis graxos, ésteres graxos, e hidrocarbonos. Por exemplo, *Synechocystis sp.* PCC6803 e *Synechococcus elongatus* PCC7942 podem servir como hospedeiros de produção e podem ser engenheiradas utilizando-se técnicas padrão de biologia molecular (*Thiel*, Genetic analysis of cyanobacteria, em THE MOLECULAR BIOLOGY OF CYANOBACTERIA, ADVANCES IN PHOTOSYNTHESIS AND RESPIRATION 581-611 (Kluwer Academic Publishers), 1994; *Koksharova* e *Wolk*, Appl. Microbiol. Biotechnol., 58: 123-137, 2002, os conteúdos dos quais estão incorporados aqui por referência. Genes da

biossíntese de ácido graxo podem ser prontamente identificados e isolados nesses organismos.

Além disso, muitas cianobactérias são produtores naturais de hidrocarbonos, tal como heptadecano, e portanto contêm genes da biossíntese de hidrocarbono que podem ser desregulados e super-expressos em conjunção com a manipulação dos seus genes de biossíntese de ácido graxo, com o intuito de aumentar a produção de hidrocarbono.

Diferentes de outras bactérias, algumas cianobactérias (*ex.*, *Synechocystis* sp. PCC6803) contêm ácidos graxos poli-insaturados nos seus lipídeos (*Murata,* Plant cell Physiol., 33: 933-941, 1992), e com isso apresentam a capacidade inerente de produzir derivados de ácido graxo poli-insaturados. Mais importantemente, cianobactérias são organismos fotossintéticos que sintetizam todo carbono celular através da captação de luz solar e fixação de dióxido de carbono. Portanto, derivados de ácido graxo produzidos em cianobactéria são diretamente derivados de CO_2.

2. <u>Produzindo hidrocarbonos a partir de redução de alcoóis primários</u>

Hidrocarbonos podem também ser produzidos utilizando oxidoredutases evoluídas para redução de alcoóis primários. Utilização de alcoóis graxos primários para produzir alcanos em microorganismos, tal como *Vibrio furnissii* M1, é conhecido. *Veja, ex., Park,* J. Bacteriol., 187:1426-1429, 2005, o conteúdo do qual é incorporado aqui por referência. Um exemplo de uma oxidoredutase que pode ser utilizada para produzir hidrocarbonos

a partir de alcoóis graxos é NAD(P)H-dependente oxidoredutase. NAD(P)H dependente oxidoredutases sintéticas podem ser produzidas através da utilização de engenharia evolucionária e podem ser expressas em hospedeiros de produção para produzir derivados de ácido graxo.

O processo de "evolução" de uma álcool graxo redutase para apresentar a atividade desejada é conhecida e praticada por aqueles versados na arte (*Kolkman* e *Stemmer,* Nat. Biotechnol., 19:423-8, 2001; *Ness et al.*, Adv. Protein Chem., 55:261-92, 2000; *Minshull* e *Stemmer*, Curr. Opin. Chem. Biol., 3:284-90, 1999; *Huisman* e *Gray,* Curr. Opin. Biotechnol., 13:352-8, 2002; U.S. Patent Publication No. 2006/0195947), os conteúdos de todos os quais estão incorporados aqui por referência.

Uma biblioteca de NAD(P)H-dependente oxidoredutases é gerada através de métodos padrão, tais como PCR suscetível de erros, mutagênese aleatória sítio específica, mutagênese de saturação sítio específica, ou mutagênese específica sítio dirigida. Adicionalmente, uma biblioteca pode ser criada através de "embaralhamento" de sequências codificantes de NAD(P)H-dependente oxidoredutase que ocorrem na natureza. A biblioteca é expressa em um hospedeiro de produção apropriado, tal como uma *E. coli*. Colônias individuais expressando um membro diferente da biblioteca de oxidoredutase são então analisadas para expressão de uma oxidoredutase que possa catalisar a redução de um álcool graxo.

Por exemplo, cada célula pode ser testada como uma bioconversão de célula inteira, um extrato celular, ou uma célula permeabilizada. Enzimas purificadas a partir da célula podem ser

analisadas também. Álcool graxo redutases são identificadas através de monitoramento por espectrofotometria ou fluorometria da oxidação dependente de álcool graxo de NAD(P)H. A produção de alcanos é monitorada através de GC-MS, TLC, ou outros métodos apropriados.

Uma oxidoredutase identificada dessa maneira é utilizada para produzir alcanos, alcenos, e hidrocarbonos ramificados relacionados. Isso é alcançado tanto *in vitro* quanto *in vivo*. O último é alcançado através da expressão do gene da álcool graxo redutase evoluída em um organismo que produz alcoóis graxos, tais como os descritos aqui. Os alcoóis graxos agem como substratos para a álcool redutase, que produz alcanos. Outras oxidoredutases podem também ser engenheiradas para catalisar essa reação, tais como aquelas que utilizam hidrogênio molecular, glutationa, FADH, ou outras coenzimas redutivas.

3. Conversão de Acil-ACP em Cetona e/ou Olefinas

Acil-ACP pode ser convertido em uma cetona e/ou uma olefina interna através da ação de enzimas condensadoras de acil, como descrito em PCT Publication No. 2008/147781 A2, as revelações das quais são incorporadas aqui por referência. Como descrito na publicação '781, peptídeos condensadores de acil incluem peptídeos que são capazes de catalisar a condensação de acil-ACP, acil-CoA, acil-AMP, ácidos graxos, e misturas destes utilizando os métodos descritos lá. Em algumas concretizações, esses peptídeos condensadores de acil apresentam especificidade de substrato alta, média ou baixa. Em certos exemplos, os peptídeos condensadores de acil são mais específicos de substratos e irão somente aceitar substratos de um comprimento

de cadeia específica. Adicionalmente, alguém de habilidade básica na arte irá apreciar que alguns peptídeos condensadores de acil irão catalisar outras reações também. Exemplos de enzimas condensadoras de acil são reveladas na publicação '781. Em adição, a publicação '781 descreve proteínas adenilantes, desidratases, e desidrogenases que podem ser utilizadas na produção de hidrocarbonos tal como olefinas internas.

Organismos recombinantes podem ser engenheirados utilizando polinucleotídeos e proteínas, por exemplo, aqueles revelados na publicação '781, para produzir hidrocarbonos e cetonas alifáticas que apresentam características estruturais definidas (*ex.*, graus de ramificação, níveis de saturação, ou comprimentos de cadeia de carbono). Um método de produção de hidrocarbonos envolve o aumento da expressão de, ou expressão de formas mais ativas de, uma ou mais enzimas condensadoras de acil (enzimas que condensam dois ou mais de acil-CoA, acil-ACP, acil-AMP, acil-éster, ácido graxo, ou misturas destes). Alguém de habilidade básica na arte irá apreciar que os produtos produzidos a partir de tais reações de condensação variam dependendo da cadeia acil que é condensada. Produtos que podem ser produzidos incluem, por exemplo, hidrocarbonos e intermediários de hidrocarbono, tal como cetonas alifáticas. As cetonas alifáticas, hidrocarbonos, e intermediários de hidrocarbonos podem ser engenheirados para apresentar características específicas de cadeia de carbono através da expressão de várias enzimas ou atenuação da expressão de várias enzimas no organismo recombinante. De acordo com a presente invenção, as tioesterases mutantes da invenção podem ser utilizadas para manipular a variação de comprimento das cadeias de carbono de espécies acil. Logo, através da utilização

de uma tioesterase mutante apresentando uma especificidade ou seletividade de substrato particulares, é possível afetar as reações subsequentes de modo a resultar em um perfil de produto de olefina ou cetona pré-determinado.

Conversão de Ácido Graxo em Aldeído

Ácidos graxos resultantes da clivagem de tioesterase podem ser convertidos em um aldeído através da ação do gene da ácido carboxílico redutase. Aldeídos podem ser produtos úteis por si só, ou eles podem servir como substratos para reações de catálise enzimática adicionais, por exemplo, na produção de alcoóis graxos *via* uma reação enzimática de álcool desidrogenase, ou na produção de alcanos via uma reação enzimática de decarbonilases. De acordo com as composições e métodos daqui, os substratos de ácido graxo da ácido carboxílico redutase podem ser manipulados de modo a atingir um perfil de produto pré-determinado no produto aldeído ou álcool graxo.

Liberação de Derivados de Ácido Graxo – Com ou Sem Proteínas de Transporte

Como descrito aqui, os derivados de ácido graxo produzidos de acordo com os métodos, composições, vetores, e células hospedeiras aqui podem ser secretados ou liberados espontaneamente de modo a permitir a recuperação extracelularmente dos produtos de derivado de ácido graxo. A velocidade de secreção espontânea pode ou não ser suficientemente rápida, e o nível de liberação pode ou não ser suficientemente completo. Portanto, opcionalmente, proteínas de transporte podem ser utilizadas para facilitar a exportação de

derivados de ácidos graxos para fora do hospedeiro de produção. Proteínas de transporte e efluxo são conhecidas por excretar uma grande variedade de compostos, e podem naturalmente ser modificadas para serem seletivas para tipos particulares de derivados de ácidos graxos. Exemplos não limitantes de proteínas de transporte apropriadas são proteínas de transporte ATP-Binding Cassette (ABC), proteínas de efluxo, e proteínas transportadora de ácido graxo (FATP). Exemplos não limitantes adicionais de proteínas de transporte apropriadas incluem as proteínas de transporte ABC proveniente de organismos tais como *Caenorhabditis elegans*, *Arabidopsis thaliana*, *Alkaligenes eutrophus*, e *Rhodococcus erythropolis*. Proteínas de transporte ABC exemplares incluem CER5, AtMRP5, AmiS2, ou AtPGP1. Em uma concretização preferencial, a proteína de transporte ABC é uma CER5 (*ex.*, AY734542)). Vetores contendo genes que expressam proteínas de transporte apropriadas podem ser inseridas em hospedeiros de produção de proteína para aumentar ou direcionar a liberação de derivados de ácido graxo.

Produção de produtos de derivados de ácido graxo de acordo com a presente invenção não requer modificação de proteína de transporte ou efluxo e é possível selecionar hospedeiros de produção pela sua habilidade endógena de liberação derivados de ácido graxo. Além disso, simplesmente através da construção de células hospedeiras de acordo com a presente revelação, por exemplo, produtos de derivado de ácido graxo que não são diferentemente conhecidos podem ser secretados ou espontaneamente liberados. A eficiência de produção de produto e liberação no caldo de fermentação podem ser expressas como uma proporção de produto intracelular para produto extracelular. Em

alguns exemplos, a proporção pode ser de por volta de 100:1, 50:1, 20:1, 10:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40 ou 1:50.

Seleção de Características de Cadeia de Carbono de Derivados de Ácidos Graxos

Derivados de ácidos graxos com pontos de ramificação, níveis de saturação, comprimento de cadeia de carbono, e características de éster particulares podem ser produzidos como desejado. Microorganismos que produzem naturalmente derivados particulares podem ser selecionados como hospedeiros de produção, e em certas circunstâncias, enzimas endógenas destes podem ser manipuladas para produzir derivados de ácido graxo de características desejadas. Alternativamente, genes que expressam enzimas que irão produzir derivados de ácido graxo particulares podem ser apropriadamente inseridos nos microorganismos hospedeiros de produção.

Em alguns exemplos, expressão de genes FAZ exógenos originados a partir de diferentes espécies ou variantes engenheiradas pode ser alcançada em um hospedeiro de produção, resultando na biossíntese de ácidos graxos que são estruturalmente diferentes (em, por exemplo, comprimento, nível de ramificação, grau de insaturação, etc.) daqueles do hospedeiro de produção nativo. Esses produtos de gene heterólogo podem também ser selecionados ou engenheirados a não serem afetados por mecanismos regulatórios naturais nas células de hospedeiro de produção, e desse modo permitir controle da produção do produto comercial desejado. Por exemplo, as enzimas FAZ provenientes de *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*,

Streptomyces spp., *Ralstonia*, *Rhodococcus*, *Corynebacteria*, *Brevibacteria*, *Mycobacteria*, levedura oleaginosas, ou similares podem ser expressas em um hospedeiro de produção apropriado. A expressão de tais enzimas exógenas irá alterar a estrutura do ácido graxo produzido.

Quando um hospedeiro de produção é engenheirado para produzir um ácido graxo com um nível específico de insaturação, ramificação, ou comprimento de cadeia de carbono, o ácido graxo engenheirado resultante pode ser utilizado na produção de derivados de ácidos graxos. Derivados de ácidos graxos gerados a partir de hospedeiros de produção podem apresentar as características do ácido graxo engenheirado.

Por exemplo, um hospedeiro de produção pode ser engenheirado para gerar ácidos graxos ramificados, de cadeia curta, que podem então ser utilizados pelo hospedeiro de produção para produzir alcoóis graxos ramificados, de cadeia curta. Similarmente, um hidrocarbono pode ser produzido através do engenheiramento de um hospedeiro de produção para produzir um ácido graxo apresentando um nível de ramificação, insaturação, e/ou comprimento de cadeia de carbono definidos, e com isso produzir um população de hidrocarbono homogêneo. Etapas adicionais podem ser empregadas para melhorar a homogeneidade do produto resultante. Por exemplo, quando um álcool insaturado, éster graxo, ou hidrocarbono é desejado, o organismo hospedeiro de produção pode ser engenheirado para produzir baixos níveis de ácidos graxos saturados, e em adição pode ser modificado para expressar uma desaturase adicional e com isso diminuir a produção de produto saturado.

Porções Ramificadas e Cíclicas

Engenheiramento de derivados de ácidos graxos ramificados e cíclicos

Ácidos graxos são intermediários chave na produção de derivados de ácido graxo. Derivados de ácido graxo contendo pontos de ramificação, porções cíclicas, e combinações destas podem ser preparadas utilizando ácidos graxos ramificados ou cíclicos.

Por exemplo, *E. coli* produz naturalmente ácidos graxos de cadeia simples (sFAs). Para engenheirar *E. coli* para produzir ácidos graxos de cadeia ramificada (brFAs), vários genes que provêm precursores ramificados (*ex.*, um operon *bkd*) podem ser introduzidos no hospedeiro de produção e expressos para permitir a iniciação de biossíntese de ácido graxo a partir de precursores ramificados (*ex.*, *fabH*). As famílias gênicas *bkd*, *ilv*, *icm*, e *fab* podem ser expressas ou super-expressas para produzir derivados de ácido graxo de cadeia ramificada. Similarmente, para produzir ácidos graxos cíclicos, genes que provêm precursores cíclicos podem ser introduzidos no hospedeiro de produção e expresso para permitir a iniciação de biossíntese de ácido graxo a partir precursores cíclicos. As famílias gênicas *ans*, *chc*, e *plm* podem ser expressas ou super-expressas para produzir ácidos graxos cíclicos.

Adicionalmente, um hospedeiro de produção pode ser engenheirado para expressar genes codificando proteínas para a elongação de brFAs (*ex.*, genes codificando ACP, FabF, etc.) e/ou para deletar ou atenuar os genes correspondentes de *E. coli* que

normalmente levam a sFAs. Nesse sentido, genes endógenos que iriam competir com os genes introduzidos (*ex.*, *fabH*, *fabF*) são deletados ou atenuados.

Os acil-CoA ramificados (*ex.*, 2-metil-butiril-CoA, isovaleril-CoA, isobutiril-CoA, etc.) são os precursores de brFA. Na maioria dos microorganismos contendo brFA, os brFA são sintetizados em duas etapas a partir de aminoácidos ramificados (*ex.*, isoleucina, leucina, ou valina) (*Kadena,* Microbiol. Rev., 55:288, 1991). Um hospedeiro de produção pode ser engenheirado a expressar ou super-expressar uma ou mais enzimas envolvidas nessas duas etapas para produzir brFAs, ou para super-produzir brFAs. Por exemplo, o hospedeiro de produção pode apresentar uma enzima endógena que pode realizar uma etapa levando a brFA, portanto somente genes codificando enzimas envolvidas na segunda etapa necessitam ser introduzidos recombinantemente.

As tioesterases mutantes da invenção podem ser engenheiradas a apresentar uma ou mais propriedades alteradas, por exemplo, especificidade alterada e/ou atividade aumentada (*ex.*, taxa catalítica), no que diz respeito aos compostos acil-CoA ou acil-ACP de cadeia ramificada ou cíclica descritos aqui. De acordo a célula recombinante produzindo derivados de ácido graxo pode ser feita para produzir preferencialmente um produto derivado de ácido graxo de cadeia ramificada ou cíclica desejada que possa apresentar alto valor como produto final.

Formação de ácidos graxos ramificados e derivados de ácido graxo ramificado

A primeira etapa na formação de brFAs é a produção dos

α-ceto ácidos correspondentes através de uma aminotransferase de aminoácido de cadeia ramificada. Hospedeiros de produção podem incluir endogenamente genes codificando tais enzimas, ou alternativamente, tais genes podem ser introduzidos recombinantemente. *E. coli*, por exemplo, expressa endogenamente tal enzima, IlvE (EC 2.6.1.42; Nº de Acesso do GenBank YP_026247). Em alguns hospedeiros de produção, uma aminotransferase heteróloga de aminoácido de cadeia ramificada pode não ser expressa. Porém, a IlvE proveniente de *E. coli* ou qualquer outra aminotransferase de aminoácido de cadeia ramificada (*ex.*, IlvE proveniente de *Lactococcus lactis* (Nº de Acesso do GenBank AAF34406), IlvE proveniente de *Pseudomonas putida* (Nº de Acesso do GenBank NP_745648), ou IlvE proveniente de *Streptomyces coelicolor* (Nº de Acesso do GenBank NP_629657)), se não endógeno, pode ser introduzido. Se uma reação de aminotransferase é limitante de taxa na biossíntese de brFA no organismo hospedeiro de produção escolhido, então a aminotransferase pode ser super-expressa.

A segunda etapa é a decarboxilação oxidativa dos α-ceto ácidos em acil-CoAs de cadeia ramificada correspondentes. Essa reação pode ser catalisada através de um complexo de desidrogenase de α-ceto ácido de cadeia ramificada (*bkd*; EC 1.2.4.4.) (*Denoya et al.*, J. Bacteriol., 177:3504, 1995), que consiste das subunidades E1α/β (decarboxilase), E2 (dihidrolipoil transacilase) e E3 (dihidrolipoil desidrogenase). Esses complexos de desidrogenase de α-ceto ácido de cadeia ramificada são similares aos complexos de desidrogenase de piruvato e α-cetoglutarato. Cada microorganismo que possui brFAs e/ou cresce em aminoácidos de cadeia ramificada pode ser

utilizado como uma fonte para isolar genes *bkd* para expressão em hospedeiros de produção tal como, por exemplo, *E. coli*. Além disso, *E. coli* apresenta o componente E3 como parte de seu complexo da piruvato desidrogenase (codificado por, por exemplo, *lpd*, EC 1.8.1.4, Nº de Acesso do GenBank NP_414658), logo pode ser suficiente somente expressar os genes E1 α/β e E2 *bkd*. **Tabela 2** recita exemplos não limitantes de genes *bkd* a partir de vários microorganismos que podem ser recombinantemente introduzidos e expressos em um hospedeiro de produção para prover precursores de acil-CoA de cadeia ramificada. Microorganismos apresentando tais genes *bkd* podem também ser utilizados como hospedeiros de produção.

Tabela 2: Genes b*kd* provenientes de microorganismos selecionados

Organismo	Gene	Nº de Acesso do GenBank
Streptomyces coelicolor	*bkdA1* (E1α)	NP_628006
	bkdB1 (E1β)	NP_628005
	bkdC1 (E2)	NP_638004
Streptomyces coelicolor	*bkdA2* (E1α)	NP_733618
	bkdB2 (E1β)	NP_628019
	bkdC2 (E2)	NP_628018
Streptomyces avermitilis	*bkdA* (E1a)	BAC72074
	bkdB (E1b)	BAC72075
	bkdC (E2)	BAC72076
Streptomyces avermitilis	*bkdF* (E1α)	BAC72088
	bkdG (E1β)	BAC72089
	bkdH (E2)	BAC72090

Bacillus subtilis	*bkdAA* (E1α)	NP_390288
	bkdAB (E1β)	NP_390288
	bkdB (E2)	NP_390288
Pseudomonas putida	*bkdA1* (E1α)	AAA65614
	bkdA2 (E1β)	AAA65615
	bkdC (E2)	AAA65617

Em outro exemplo, isobutiril-CoA pode ser obtida em um hospedeiro de produção, por exemplo em *E. coli*, através da co-expressão de uma crotonil-CoA redutase (Ccr, EC 1.6.5.5, 1.1.1.1) e isobutiril-CoA mutase (subunidade maior IcmA, EC 5.4.99.2; subunidade menor IcmB, EC 5.4.99.2) (*Han* e *Reynolds*, J. Bacteriol., 179:5157, 1997). Crotonil-CoA é um intermediário na biossíntese de ácido graxo em *E. coli* e outros microorganismos. Exemplos não limitantes de genes *ccr* e *icm* a partir de microorganismos selecionados são dados na **Tabela 3.**

Tabela 3: Genes *ccr* e *icm* provenientes de microorganismos selecionados

Organismo	Gene	Nº de Acesso do GenBank
Streptomyces coelicolor	*ccr*	NP_630556
	icmA	NP_629554
	icmB	NP_630904
Streptomyces cinnamonensis	*ccr*	AAD53915
	icmA	AAC08713
	icmB	AJ246005

Em adição à expressão dos genes *bkd*, a iniciação da biossíntese de brFA utiliza β-cetoacil-acil-proteína-carreadora sintase III (FabH, EC 2.3.1.41) com especificidade para acil-CoAs de cadeia ramificada (Li *et al.*, *J. Bacteriol.*, 187:3795-3799, 2005). Exemplos não limitantes de tais enzimas FabH são

listadas na **Tabela 4.** Genes *fabH* que são envolvidos na biossíntese de ácido graxo de qualquer microorganismo contendo brFA podem ser expressos em um hospedeiro de produção. As enzimas Bkd e FabH provenientes de hospedeiros de produção que não produzem naturalmente brFA podem não suportar a produção de brFA, portanto Bkd e FabH podem ser expressos recombinantemente. Vetores contendo os genes *bkd* e *fabH* podem ser inseridos em tal hospedeiro de produção. Similarmente, o nível endógeno de produção de Bkd e FabH pode não ser suficiente para produzir brFA, portanto, eles podem ser super-expressos. Adicionalmente, outros componentes da via de biossíntese de ácido graxo pode ser expressos ou super-expressos, tais como proteínas carreadoras acil (ACPs) e β-cetoacil-acil-proteína-carreadora sintase II (codificado por *fabF*, EC 2.3.1.41) (exemplos não limitantes de candidatos estão listados na **Tabela 4**). Em adição à expressão desses genes, alguns genes na via de biossíntese de ácido graxo endógena podem ser atenuados no hospedeiro de produção. Genes codificando enzimas que competem por substrato(s) com as enzimas da via que resultam na produção de brFA podem ser atenuados para aumentar a produção de brFA. Por exemplo, em *E. coli* os candidatos mais prováveis a interferir com a biossíntese de brFA são os genes *fabH* (Nº de Acesso do GenBank NP_415609) e/ou *fabF* (Nº de Acesso do GenBank NP_415613).

Tabela 4: Genes *fabH*, ACP e *fabF* selecionados a partir de microorganismos selecionados com brFAs

Organismo	Gene	Nº de Acesso do GenBank
Streptomyces coelicolor	*fabH1*	NP_626634
	ACP	NP_626635
	fabF	NP_626636

Streptomyces avermitilis	*fabH3* *fabC3* (ACP) *fabF*	NP_823466 NP_823467 NP_823468
Bacillus subtilis	*fabH_A* *fabH_B* ACP *fabF*	NP_389015 NP_388898 NP_389474 NP_389016
Stenotrophomonas maltophilia	SmalDRAFT_0818 (*fabH)* SmalDRAFT_0821 (ACP) SmalDRAFT_0822 (*fabF)*	ZP_01643059 ZP_01643063 ZP_01643064
Legionella pneumophila	*FabH* ACP *fabF*	YP_123672 YP_123675 YP_123676

Como mencionado abaixo, alcoóis de cadeia ramificada podem ser produzidos através da combinação de genes expressos que suportam a síntese de brFA e síntese de álcool. Por exemplo, quando um gene codificando um álcool redutase, tal como *acr1* proveniente de *Acinetobacter baylyi* ADP1, é co-expresso com um operon *bkd* em uma célula hospedeira de *E. coli*, a célula hospedeira pode sintetizar isopentanol, isobutanol, ou 2-metil butanol. Similarmente, quando *acr1* é co-expresso como os genes *ccr/icm* em uma célula hospedeira de *E. coli*, a célula hospedeira pode sintetizar isobutanol.

Formação de ácidos graxos cíclicos e derivados de ácido graxo cíclico

Para converter um hospedeiro de produção tal como uma *E. coli* em um organismo capaz de sintetizar ácidos graxos ω-cíclicos

(cyFA), um gene que provê o precursor cíclico ciclohexilcarbonil-CoA (CHC-CoA) (*Cropp et al.*, Nature Biotech., 18:980-983, 2000) é introduzido e expresso no hospedeiro de produção. Uma conversão similar é possível para outros hospedeiros de produção, ou exemplo, bactéria, levedura e fungos filamentosos.

Exemplos não limitantes de genes que provêm CHC-CoA em *E. coli* incluem: *ansJ*, *ansK*, *ansL*, *chcA*, e *ansM* proveniente do aglomerado gênico de ansatrienina de *Streptomyces collinus* (*Chen et al.*, Eur. J. Biochem., 261: 98-107, 1999), ou *plmJ*, *plmK*, *plmL*, *chcA*, e *plmM* proveniente do aglomerado gênico de foslactomicina B de *Streptomyces sp. HK803* (*Palaniappan et al.*, J. Biol. Chem., 278:35552-35557, 2003) juntamente com o gene *chcB* (*Patton et al.*, Biochem., 39:7595-7604, 2000) proveniente de *S. collinus*, *S. avermitilis*, ou *S. coelicolor* (*veja* **Tabela 5** para Nºs de Acesso do GenBank). Os genes listados abaixo na **Tabela 4** podem então ser expressos para permitir a iniciação e elongação dos ácidos graxos ω-cíclicos. Alternativamente, os genes homólogos podem ser isolados a partir de microorganismos que produzem cyFA e expressam em *E. coli*.

Tabela 5: Genes para a síntese de CHC-CoA

Organismo	Gene	Nº de Acesso do GenBank
Streptomyces collinus	*ansJK* *ansL* *chcA* *ansM* *chcB*	U72144* AF268489
Streptomyces sp. HK803	*pmlJK*	AAQ84158

	pmlL *chcA* *pmlM*	AAQ84159 AAQ84160 AAQ84161
Streptomyces coelicolor	*chcB/caiD*	NP_629292
Streptomyces avermitilis	*chcB/caiD*	NP_629292

*Somente *chcA* é anotado no GenBank entry U72144, *ansJKLM* são de acordo com *Chen et al.*, Eur. J. Biochem., 261:98-107, 1999.

Os genes listados na **Tabela 4** (*fabH*, ACP, e *fabF*) são suficientes para permitir a iniciação e elongação dos ácidos graxos ω-cíclicos porque eles tipicamente apresentam ampla especificidade de substrato. Se a co-expressão de qualquer um desses genes com os genes *ansJKLM/chcAB* ou *pmlJKLM/chcAB* da **Tabela 5** não gera cyFA, então homólogos *fabH*, ACP, e/ou *fabF* a partir de microorganismos que geram cyFAs podem ser isolados (*ex.*, através da utilização de oligos de PCR degenerados ou sonda de sequência de DNA heterólogo) e co-expressos. **Tabela 6** lista exemplos não limitantes de microorganismos que contêm ácidos graxos ω-cíclicos.

Tabela 6: Exemplos não limitantes de microorganismos que contêm ácidos graxos ω-cíclicos

Organismo	Referência
Curtobacterium pusillum	ATCC19096
Alicyclobacillus acidoterrestris	ATCC49025
Alicyclobacillus acidocaldarius	ATCC27009
Alicyclobacillus cycloheptanicus *	*Moore*, J. Org. Chem., 62:pp. 2173, 1997.

*Utiliza cicloheptilcarbonil-CoA e não ciclohexilcarbonil-

CoA como precursor para biossíntese de cyFA.

Saturação

Ácidos graxos são os intermediários chave na produção dos derivados de ácido graxo. Os graus de saturação nos derivados de ácido graxo podem ser controlados através da regulação dos graus de saturação dos intermediários de ácido graxo. As famílias gênicas *sfa*, *gns*, e *fab* podem ser expressas ou super-expressas para controlar a saturação de ácidos graxos.

Hospedeiros de produção podem ser engenheirados para produzir ácidos graxos insaturados através do engenheiramento do hospedeiro de produção para super-expressar *fabB*, ou através do crescimento do hospedeiro de produção a temperaturas baixas (*ex.*, menos que 37°C). FabB apresenta preferência por cis-δ^3 decenoil-ACP, e resulta na produção de ácido graxo insaturado em *E. coli*. Super-expressão do gene *fabB* resulta na produção de uma porcentagem significativa de ácidos graxos insaturados (*de Mendoza et al.*, J. Biol. Chem., 258:2098-101, 1983). O gene *fabB* pode ser inserido em e expresso nos hospedeiros de produção que não apresentam naturalmente o gene. Esses ácidos graxos insaturados podem então ser utilizados como intermediários nos hospedeiros de produção que são engenheirados para produzir derivados de ácido graxo, tais como alcoóis graxos, ésteres graxos, ceras, olefinas, alcanos, e similares.

Alternativamente, repressores da biossíntese de ácido graxo, por exemplo, um repressor (Nº de Acesso do GenBank NP_418398) codificado por *fabR*, pode ser deletado. Isso também irá resultar em produção aumentada de ácido graxo insaturado em

E. coli (*Zhang et al.*, J. Biol. Chem., 277:15558, 2002). Deleções similares podem ser feitas em outros hospedeiros de produção. Aumento adicional em ácidos graxos insaturados podem ser alcançados, por exemplo, através da super-expressão de *fabM* (codificando trans-2, cis-3-decenoil-ACP isomerase, Nº de Acesso do GenBank DAA05501) e expressão controlada de *fabK* (codificando trans-2-enoil-ACP redutase II, Nº de Acesso do GenBank NP_357969) proveniente de *Streptococcus pneumoniae* (*Marrakchi et al.*, J. Biol. Chem., 277: 44809, 2002), enquanto deletando *fabI* de *E. coli* (codificando trans-2-enoil-ACP redutase, Nº de Acesso do GenBank NP_415804). Adicionalmente, para aumentar a porcentagem dos ésteres graxos insaturados, o hospedeiro de produção pode também super-expressar *fabB* (codificando β-cetoacil-ACP sintase I, Nº de Acesso do GenBank BAA16180, EC:2.3.1.41), *sfa* (codificando um supressor de *fabA*, Nº de Acesso do GenBank AAC44390), e *gnsA* e *gnsB* (ambos codificando supressores mutante nulos *secG*, Nº de Acesso do GenBank ABD18647.1 e Nº de Acesso do GenBank AAC74076.1, respectivamente). Em alguns exemplos, o gene endógeno *fabF* pode ser atenuado, com isso aumentando o porcentagem do palmitoleato ($C_{16:1}$) produzido.

As tioesterases mutantes da invenção podem ser engenheiradas para apresentar propriedades alteradas, por exemplo, especificidade alterada e/ou atividade aumentada, no que diz respeito a compostos acil-CoA ou acil-ACP substituído ou não substituído que são preparados como descritos aqui. De acordo a célula recombinante produzindo derivados de ácido graxo podem ser feitas para produzir preferencialmente um perfil de saturação desejado em um produto de derivado de ácido graxo que podem apresentar alto valor como um produto final.

Comprimentos de Cadeia e Características de Éster

Comprimentos de cadeia e produção de cadeias de número ímpar

Os métodos descritos aqui permitem a produção de ésteres graxos e derivados de ácido graxo de comprimentos de cadeia variada através da seleção de uma tioesterase mutante apropriada que apresenta especificidade e/ou seletividade por um substrato de um comprimento de cadeia de carbono específico. Através da expressão das tioesterases específicas, ácidos graxos e derivados de ácido graxo apresentando comprimentos de cadeia de carbono desejado podem ser produzidos. Em algumas concretizações, uma tioesterase endógena pode ser mutada utilizando técnicas de alteração genômica conhecidas. Ou, um gene codificando uma tioesterase particular pode ser introduzido heterologamente em um hospedeiro de produção de modo que um ácido graxo ou derivado de ácido graxo de um comprimento de cadeia de carbono particular é produzido. Em certas concretizações, expressão de tioesterases endógenas é suprimida. As tioesterases mutantes da invenção podem ser engenheiradas para apresentar propriedades alteradas, por exemplo, especificidade alterada e/ou atividade aumentada, no que diz respeito aos comprimentos de cadeia específicos de compostos acil-CoA ou acil-ACP descritos aqui. De acordo, a célula recombinante produtora dos derivados de ácido graxo pode ser feita para preferencialmente produzir um produto derivado de ácido graxo com o comprimento de cadeia e/ou alto valor desejado como um produto final.

Em uma concretização, o derivado de ácido graxo contém uma cadeia de carbono de por volta de 4 a 36 átomos de carbono, por volta de 6 a 32 átomos de carbono, por volta de 10 a 30 átomos

de carbono, por volta de 10 a 18 átomos de carbono, por volta de 24 a 32 átomos de carbono, por volta de 26 a 30 átomos de carbono, por volta de 26 a 32 átomos de carbono, por volta de 5 a 10 átomos de carbono, por volta de 10 a 16 átomos de carbono, ou por volta de 12 a 18 átomos de carbono. Em uma concretização alternativa, o derivado de ácido graxo contém uma cadeia de carbono menor que por volta de 20 átomos de carbono, menor que por volta de 18 átomos de carbono, ou menor que por volta de 16 átomos de carbono. Em outra concretização, o produto de éster graxo é um produto de éster graxo saturado ou insaturado apresentando um átomo de carbono contendo entre 24 e 46 átomos de carbono. Em uma concretização, o produto de éster graxo apresenta um conteúdo de átomo de carbono entre 24 e 32 átomos de carbono. Em outra concretização, o produto de éster graxo apresenta um conteúdo de carbono de 14 e 20 carbonos. Em outra concretização, o éster graxo é o metil éster de $C_{18:1}$. Em outra concretização, o éster graxo é o etil éster de $C_{16:1}$. Em outra concretização, o éster graxo é o metil éster de $C_{16:1}$. Em ainda outra concretização, o éster graxo é octadecil éster de octanol.

Certos microorganismos produzem preferencialmente ácidos graxos e derivados de ácido graxo de cadeia de carbono de número par ou ímpar. Por exemplo, *E. coli* normalmente produz ácidos graxos e etil ésteres de ácido graxo (FAEE) de cadeia de carbono de número par. Surpreendentemente, os métodos revelados aqui podem ser utilizados para alterar aquela produção. Por exemplo, *E. coli* pode ser feita para produzir ácidos graxos e FAEE de cadeia de carbono de número ímpar sob certas circunstâncias.

Características de Éster

Um éster tipicamente inclui o que pode ser designado um lado "A" e um lado "B". O lado B pode ser contribuído por um ácido graxo produzido a partir de síntese *de novo* no organismo hospedeiro de produção. Em algumas concretizações, onde o hospedeiro de produção é adicionalmente engenheirado a fazer alcoóis, incluindo alcoóis graxos, o lado A é também produzido pelo organismo hospedeiro de produção. Em ainda outras concretizações, o lado A pode ser provido através do meio de crescimento. Através da seleção dos genes de tioesterase desejados, o lado B (e o lado A quando alcoóis graxos estão sendo feitos) pode ser desenhado para apresentar certas características de cadeia de carbono desejadas. Essas características incluem, por exemplo, pontos de ramificação, pontos de insaturação, e comprimentos de cadeia de carbono desejados. Logo, as tioesterases mutantes da invenção podem ser engenheiradas para apresentar propriedades alteradas, por exemplo, especificidade alterada e/ou atividade aumentada, no que diz respeito à preferência de aceitar certos compostos acil-CoA ou acil-ACP como uma cadeia de lado A como descrito aqui. De acordo a célula recombinante produzindo os derivados de ácido graxo podem ser feitos de modo a produzir preferencialmente um produto de derivado de ácido graxo desejado que seja valoroso como um produto final.

Quando genes de tioesterases particulares são selecionados, os lados A e B irão apresentar características de cadeia de carbono similares quando eles são ambos contribuídos pelo hospedeiro de produção utilizando intermediários da via biossintética de ácido graxo. Por exemplo, pelo menos pro volta de 50%, 60%, 70%, ou 80% dos ésteres graxos produzidos irão

apresentar lados A e B que variam em por volta de 2, 4, 6, 8, 10, 12, ou 14 carbonos de comprimento. O lado A e o lado B podem também apresentar níveis de ramificação e saturação similares.

Em adição a produzir alcoóis graxos que contribuem para o lado A, o hospedeiro de produção pode produzir outros alcoóis de cadeia curta tais como etanol, propanol, isopropanol, isobutanol, e butanol para incorporação do lado A utilizando técnicas bem conhecidas na arte. Por exemplo, butanol pode ser feito através do organismo hospedeiro de produção. Para criar células produtoras de butanol, a cepa LS9001, por exemplo, pode ser adicionalmente engenheirada para expressar *atoB* (acetil-CoA acetiltransferase) proveniente de *Escherichia coli* K12, β-hidroxibutiril-CoA desidrogenase proveniente de *Butyrivibrio fibrisolvens,* crotonase proveniente de *Clostridium beijerinckii,* butiril CoA desidrogenase proveniente de *Clostridium beijerinckii,* aldeído desidrogenase acetiladora de CoA (ALDH) proveniente de *Cladosporium fulvum,* e adhE codificando um aldeído-álcool desidrogenase de *Clostridium acetobutylicum* no vetor de expressão pBAD24 sob o sistema promotor *prpBCDE*. Outros organismos hospedeiros de produção podem ser similarmente modificados para produzir butanol ou outros alcoóis de cadeia curta. Por exemplo, etanol pode ser produzido em um hospedeiro de produção utilizando os métodos descritos por *Kalscheuer et al.*, Microbiology, 152:2529-2536, 2006, que estão incorporados aqui por referência.

Engenharia Genética de Cepa de Produção para Aumentar/Melhorar a Produção/Produtividade de Derivados de Ácidos Graxos

Sequências polinucleotídicas heterólogas envolvidas em uma via biossintética para a produção de derivados de ácido graxo podem ser introduzidas estavelmente ou transientemente em uma célula hospedeira de produção utilizando técnicas conhecidas na arte. Exemplos não limitantes de tais técnicas incluem eletroporação, precipitação com fosfato de cálcio, transfecção mediada por DEAE-dextran, transfecção mediada por lipossomo, conjugação, transdução, e integração genética. Para transformação estável, uma sequência de DNA pode adicionalmente incluir um marcador de seleção, incluindo, por exemplo, marcadores para resistência a antibióticos, e genes que complementam deficiências auxotróficas. Por outro lado, polinucleotídeos endógenos envolvidos na via biossintética para a produção de derivados de ácido graxo podem também ser mutados utilizando técnicas conhecidas de alteração genômica. Essas estratégias podem ser aplicadas separadamente ou em combinação.

Várias concretizações daqui utilizam um vetor de expressão que inclui uma sequência de DNA heterólogo codificando uma proteína envolvida em uma via metabólica ou biossintética. Vetores de expressão apropriados incluem, porém não se limitam a, vetores virais (tais como vetores de baculovírus), vetores de fago (tais como vetores de bacteriófagos), plasmídeos, fagemídeos, cosmídeos, fosmídeos, cromossomos artificias de bactéria, vetores virais (*ex.*, vetores virais baseados no vírus vaccinia, poliovírus, adenovírus, vírus adeno-associado, SV40, vírus herpes simplex, e similares), cromossomos artificiais baseados em P1, plasmídeos de levedura, cromossomos artificiais de levedura, e qualquer outros vetores para hospedeiros de produção de interesse (tais como *E. coli*, *Pseudomonas pisum*, e

Saccharomyces cerevisiae).

Vetores de expressão úteis podem incluir um ou mais genes marcadores de seleção para prover um traço fenotípico para seleção de células hospedeiras de produção transformadas. O gene marcador de seleção codifica uma proteína necessária para a sobrevivência ou crescimento de células hospedeiras de produção transformadas em um meio de cultura seletivo. Células hospedeiras de produção não transformadas com o vetor contendo o gene marcador de seleção não irá sobreviver no meio de cultura. Genes de seleção típicos codificam proteínas que (a) conferem resistência a antibióticos ou outras toxinas (*ex.*, ampicilina, neomicina, metotrexato, ou tetraciclina); (b) complementam deficiências auxotróficas; ou (c) suplementam nutrientes críticos não disponíveis no meio complexo (*ex.*, o gene que codifica mistura racêmica de D-alanina para *Bacilli*). Em concretizações alternativas, o gene marcador de seleção é um que codifica dihidrofolato redutase ou confere resistência a neomicina (para utilização em cultura de célula eucariótica), ou uma que confere resistência a tetraciclina ou ampicilina (para utilização em uma célula hospedeira de produção procariótica, tal como em *E. coli*).

No vetor de expressão, a sequência de DNA codificando o gene na via biossintética está operacionalmente ligado a uma sequência de controle de expressão apropriada (*ex.*, promotores, intensificadores, e similares) para direcionar a síntese do produto gênico codificado. Tais promotores podem ser derivados a partir de fontes microbianas ou virais, incluindo, por exemplo, provenientes de CMV e SV40. Dependendo do sistema de hospedeiro

de produção/vetor utilizado, qualquer número de elementos de controle de transcrição e tradução apropriados podem ser utilizados no vetor de expressão, incluindo promotores constitutivos e induzíveis, elementos intensificadores de transcrição, terminadores de transcrição, e similares. *Veja, ex., Bitter et al.*, Methods in Enzymology, 153:516-544, 1987.

Promotores apropriados para utilização em células hospedeiras de produção procarióticas incluem, porém não são limitadas a, promotores capazes de reconhecer as polimerases T4, T3, Sp6 e T7, os promotores P_R e P_L de bacteriófago lambda, os promotores *trp*, *recA*, heat shock, e *lacZ* de *E. coli*, os promotores alfa-amilase e específico de sigma de *B. subtilis*, os promotores dos bacteriófagos de *Bacillus*, promotores de *Streptomyces*, o promotor *int* de bacteriófago lambda, o promotor *bla* do gene da beta-lactamase de pBR322, e o promotor CAT do gene da cloramfenicol acetil transferase. Promotores procarióticos são revisados por *Glick, J.* Indust. Microbiol., 1:277, 1987; *Watson et al.*, MOLECULAR BIOLOGY OF THE GENE, 4th Ed. (1987), Benjamin Cummins (1987); e *Sambrook et al.*, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2ª Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), as revelações das quais estão incorporadas aqui por referência. Exemplos não limitantes de promotores eucarióticos apropriados para utilização dentro de um hospedeiro de produção eucariótico são virais em origem e incluem o promotor do gene metalotioneína I de camundongo (*Hamer et al.*, J. Mol. Appl. Gen., 1:273, 1982); o promotor TK de herpes vírus (*McKnight,* Cell, 31:355, 1982); o promotor inicial SV40 (*Benoist et al.*, Nature, 290:304, 1981); o promotor de citomegalovírus (*Foecking et al.*, Gene, 45:101, 1980); o promotor do gene *gal4*

de levedura (*Johnston et al.*, PNAS (USA), 79:6971, 1982; *Silver et al.*, PNAS (USA), 81:5951, 1984); e o promotor *IgG* (*Orlandi et al.*, PNAS (USA), 86:3833, 1989), os conteúdos dos quais estão incorporados aqui por referência.

O hospedeiro de produção pode ser geneticamente modificado com uma sequência gênica heteróloga codificando um produto gênico de via biossintética que está operacionalmente ligado a um promotor induzível. Promotores induzíveis são conhecidos na arte. Exemplos não limitantes de promotores induzíveis apropriados incluem promotores que são afetados por proteínas, metabólitos, ou químicos. Esses incluem, porém não são limitados a: um promotor de vírus de leucemia bovina, um promotor de metalotioneína, um promotor MMTV induzível por dexametasona, um promotor SV40, um promotor *polIII* de MRP, um promotor CMV induzível por tetraciclina (tal como o promotor CMV inicial imediato de humano) assim como aqueles provenientes dos operons *trp* e *lac*.

Em alguns exemplos, um hospedeiro de produção é geneticamente modificado com uma sequência gênica heteróloga codificando um produto gênico de via biossintética que está operacionalmente ligado a um promotor constitutivo. Promotores constitutivos apropriados são conhecidos na arte e incluem promotores tardios principais constitutivos de adenovírus, um promotor MPSV constitutivo, ou um promotor CMV constitutivo.

Em alguns exemplos, um hospedeiro de produção modificado é um que é geneticamente modificado com uma sequência gênica exógena codificando um proteína única envolvida em uma via biossintética. Em outras concretizações, um hospedeiro de

produção modificado é um que é geneticamente modificado com sequências gênicas exógenas codificando duas ou mais proteínas envolvidas em uma via biossintética, por exemplo, uma primeira e segunda enzimas em uma via biossintética.

Quando um hospedeiro de produção é geneticamente modificado para expressar duas ou mais proteínas envolvidas em um via biossintética, aquelas sequências gênicas podem cada estar contidas em um único vetor de expressão ou em vetores de expressão separados. Quando aquelas sequências gênicas estão contidas em um único vetor de expressão, em algumas concretizações, as sequências polinucleotídicas estarão operacionalmente ligadas a um elemento de controle em comum caracterizado pelo fato do elemento de controle em comum controlar a expressão de todas as sequências gênicas codificando proteínas da via biossintética no único vetor de expressão (*ex.*, um promotor).

Quando um hospedeiro de produção modificado é geneticamente modificado com sequências de DNA heterólogo codificando duas ou mais proteínas envolvidas em uma via biossintética, uma das sequências de DNA pode estar operacionalmente ligada a um promotor induzível, e uma ou mais das sequências de DNA podem estar operacionalmente ligada a um promotor constitutivo.

Em algumas concretizações, a concentração intracelular (*i.e.*, a concentração dentro do hospedeiro de produção modificado geneticamente) de um intermediário de via biossintética pode ser aumentada para estímulo adicional da produtividade do produto final. A concentração intracelular do intermediário pode ser aumentada de várias maneiras, incluindo,

porém não limitado a, aumento da concentração no meio de cultura de um substrato para uma via biossintética; aumento da atividade catalítica de uma enzima que é ativa na via biossintética; aumento da quantidade intracelular de um substrato (*ex.*, um substrato primário) para uma enzima que é ativa na via biossintética; e similares.

Em alguns exemplos, o derivado de ácido graxo ou intermediário é produzido no citoplasma do hospedeiro de produção. A concentração citoplasmática pode ser aumentada de várias maneiras, incluindo, porém não limitada a, ligação do ácido graxo a coenzima A para formar um acil-CoA tioéster. Adicionalmente, a concentração de acil-CoA pode ser aumentada através do aumento da biossíntese de CoA na célula, tal como através da super-expressão de genes associados com a biossíntese de pantotenato (*ex.*, *panD*) ou através da eliminação de genes associados com a biossíntese de glutationa (*ex.*, glutationa sintase).

Sequências regulatórias, sequências codificantes, e combinações destas, podem ser introduzidas ou alteradas no cromossomo do hospedeiro de produção. Em alguns exemplos, a integração da sequência recombinante desejada na sequência genômica do hospedeiro de produção não requer a utilização de um marcador de seleção tal como um antibiótico. Em alguns exemplos, as alterações genômicas incluem mudança da sequência de controle dos genes alvo através da substituição do(s) promotor(es) nativo(s) por um promotor que é insensível a regulação. Existem numerosas abordagens para fazer isso. Por exemplo, *Valle* e *Flores*, em *Methods Mol. Biol.*, 267:113-122, 2006, descrevem um

método baseado em PCR para super-expressar genes cromossomais em *E. coli*. O conteúdo de *Valle* e *Flores* está incorporado aqui por referência. Outra abordagem é baseada na utilização de oligonucleotídeos de fita simples para criar mutações específicas diretamente no cromossomo, utilizando a técnica desenvolvida por *Court et al.*, PNAS(USA), 100:15748-15753, 2003, o conteúdo do qual está também incorporada aqui por referência. Essa técnica é baseada na utilização da super-expressão da proteína Beta proveniente do bacteriófago lambda para aumentar a recombinação genética. As vantagens dessa abordagem incluem que oligonucleotídeos sintéticos com 70 bases (ou mais) de comprimento podem ser utilizados para criar mutações pontuais, inserções, e deleções, com isso eliminando quaisquer etapas de clonagem. Além disso, o sistema é suficientemente eficiente de modo que nenhum marcador é necessário para isolar as mutações desejadas.

Com essa abordagem a região regulatória de um gene pode ser modificada para criar um promotor mais forte e/ou eliminar o sítio de ligação de um repressor. De acordo, um gene desejado pode ser super-expresso no organismo hospedeiro de produção.

Fermentação

Maximizando a Eficiência de Produção

Produção e isolamento de derivados de ácido graxo podem ser melhorados através do emprego de técnicas de fermentação específicas. Um método para maximizar a produção enquanto reduzindo custos é o aumento da porcentagem da fonte de carbono que é convertida em produtos de hidrocarbono.

Durante ciclos de vida celular normais, o carbono é utilizado em funções celulares para produzir lipídeos, sacarídeos, proteínas, ácidos orgânicos, e polinucleotídeos. A redução da quantidade de carbono necessário para atividades relacionadas ao crescimento podem aumentar a eficiência da conversão da fonte de carbono para produto final. Isso pode ser alcançado primeiramente através de crescimento de microorganismos a uma densidade desejada, que é alcançado no pico da fase log de crescimento. Depois, a replicação dos genes de ponto de checagem pode ser bloqueada para parar o crescimento das células. Especificamente, mecanismos sensor de quórum (como revisado em *Camilli* e *Bassler*, Science, 311:1113, 2006; *Venturi*, FEMS Microbio. Rev., 30:274-291, 2006; e *Reading* e *Sperandio*, FEMS Microbiol. Lett., 254:1-11, 2006, as revelações das quais estão incorporadas aqui por referência) podem ser utilizadas para ativar genes associados com a fase estacionária.

Genes que podem ser ativadas para parar a replicação e crescimento celulares em *E. coli* inclui os genes *umuDC*, a super-expressão dos quais para a progressão da fase estacionária até o crescimento exponencial (*Murli et al.*, J. of Bact., 182:1127, 2000). UmuC é uma DNA polimerase que pode conduzir a síntese trans-lesão sobre lesões não codificantes – a base da mecânica da maioria das mutagênese por UV e químicas. Os produtos gênicos *umuDC* são utilizados para o processo de síntese de trans-lesão e também servem como pontos de checagem de dano de sequência polinucleotídica. Os produtos gênicos *umuDC* incluem UmuC, UmuD, umuD', UmuD'$_2$C, UmuD'$_2$, e/ou UmuD$_2$. Nesse meio tempo, os genes produtores de produto podem ser ativados, com isso minimizando a necessidade para vias de replicação e manutenção para ser

utilizada enquanto o derivado de ácido graxo está sendo feito. Microorganismos hospedeiros de produção podem também ser engenheirados a expressar *umuC* e/ou *umuD* provenientes de *E. coli* em pBAD24 sob o sistema promotor *prpBCDE* através de síntese *de novo* desses genes com os genes de produção de produto final apropriados.

A porcentagem de carbonos iniciais convertidos a ésteres graxos ou produtos de hidrocarbono é um direcionador de custo. Quanto mais eficiente o processo (*i.e.*, quanto maior a porcentagem de carbonos iniciais convertidos em ésteres graxos ou produtos de hidrocarbono), menos caro ele custa. Para fontes de carbono contendo oxigênio (*ex.*, glicose e outras fontes baseadas em carboidrato), o oxigênio é liberado na forma de dióxido de carbono. Para cada 2 átomos de oxigênio liberados, um átomo de carbono é também liberado, levando a uma eficiência metabólica teorética máxima de por volta de 34% (w/w) (para produtos derivados de ácido graxo). Essa figura, porém, muda para outros produtos de hidrocarbono e fontes de carbono. Eficiências típicas na literatura são de por volta de <5%. Hospedeiros de produção engenheirados a produzir produtos de hidrocarbono podem apresentar eficiência maior que por volta de 1%, por exemplo, maior que por volta de 3%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, ou 30%. Em um exemplo, hospedeiros de produção irão exibir uma eficiência de por volta de 10% a por volta de 25%. Em outros exemplos, tais hospedeiros de produção irão exibir uma eficiência de por volta de 25% a por volta de 30%. Em outros exemplos, tais hospedeiros de produção irão exibir eficiência >30%.

O hospedeiro de produção pode ser adicionalmente engenheirado a expressar celulossomas recombinantes, tais como aqueles descritos em PCT application number PCT/US2007/003736, incorporado aqui por referência na sua íntegra, que pode permitir ao hospedeiro de produção para utilizar material celulósico como uma fonte de carbono. Por exemplo, o hospedeiro de produção pode ser adicionalmente engenheirado para expressar invertases (EC 3.2.1.26) de modo que a sacarose possa ser utilizada como uma fonte de carbono.

Similarmente, o hospedeiro de produção pode ser engenheirado utilizando os ensinamentos descritos em U.S. Patent Nos. 5.000.000; 5.028.539; 5.424.202; 5.482.846; e 5.602.030, todos incorporados aqui por referência na sua íntegra, de modo que o hospedeiro de produção possa assimilar carbono eficientemente e utilizar materiais celulósicos como fontes de carbono.

Em um exemplo, a câmara de fermentação engloba uma corrida/mistura de fermentação que está sofrendo uma redução contínua. Nesse exemplo, um ambiente redutivo estável é criado. O balanço de elétron é mantido através da liberação de dióxido de carbono (na forma gasosa). Esforços para aumentar o balanço NAD/H e NADP/H podem também facilitar na estabilização do balanço de elétrons.

A disponibilidade de NADPH intracelular pode também ser aumentada através do engenheiramento do hospedeiro de produção para expressar uma NADH:NADPH transidrogenase. A expressão de uma ou mais NADH:NADPH transidrogenases converte o NADH produzido em glicólise em NADPH o que melhora na produção de

derivados de ácido graxo.

Produção de Hidrocarbono em Pequena Escala

Para produção de produto de hidrocarbono em pequena escala, células BL21(DE3) de *E. coli* contendo pBAD24 (com resistência a ampicilina e via de síntese de produto final) assim como pUMVC1 (com resistência a canamicina e sistema de super-expressão de acetil CoA/malonil CoA) são incubados ao longo da noite em frascos de 2 Litros a 37°C, agitados a >200 rpm em 500 mL de meio LB suplementados com 75 µg/mL de ampicilina e 50 µg/mL de canamicina até as culturas atingirem uma DO_{600} de >0,8, células são suplementadas com propionato de sódio 25 mM (em pH 8,0) para ativar os sistemas de genes engenheirados para produção, e para parar a proliferação celular através da ativação de proteínas UmuC e UmuD. A etapa de indução é desempenhada por 6 horas a 30°C. Após incubação, o meio é examinado para produto de hidrocarbono utilizando GC-MS.

Produção de Hidrocarbono em Larga Escala

Para produção de produto em larga escala, os hospedeiros de produção engenheirados são crescidos em levas de 10 Litros, 100 Litros, ou mais; fermentados; e induzidos a expressar os produtos desejados baseados em genes específicos codificados nos plasmídeos apropriados contidos neles.

Por exemplo, células BL21(DE3) de *E. coli* contendo pBAD24 (com resistência a ampicilina e via de síntese de produto final) assim como pUMVC1 (com resistência a canamicina e sistema de super-expressão de acetil CoA/malonil CoA) são incubadas em

cultura de semeadura de 500-mL para uma corrida de fermentação de 10-Litros (ou uma cultura de semeadura de 5-Litros para uma corrida de fermentação de 100-Litros) em um meio LB (livre de glicerol) contendo 50 µg/mL de canamicina e 75 µg/mL de ampicilina a 37°C, que é agitada a >200 rpm até a cultura atingirem uma DO_{600} de >0,8, um processo que tipicamente leva em torno de 16 horas. O meio de fermentação é continuamente suplementado com um fosfato de sódio de 25 mM, em pH 8,0, com o intuito de ativar os sistemas de genes engenheirados para produção, e para parar a proliferação celular através da ativação de proteínas UmuC e UmuD. O meio também é continuamente suplementado com glicose para manter uma concentração de 25 g/100 mL.

Após a primeira hora de indução, uma alíquota de não mais que 10% do volume de célula total é removido a cada hora e permitido a assentar sem agitação, o que por sua vez permite que produto(s) de hidrocarbono vá(ão) para a superfície, sofrendo uma separação de fase espontânea. O componente de hidrocarbono é coletado e a fase aquosa é retornada à câmara de reação. A câmara de reação é operada continuamente. Quando a DO_{600} cai abaixo de por volta de 0,6, as células são substituídas com uma nova leva crescida a partir de uma cultura de semeadura.

Para produção de éster de cera, os ésteres de cera são isolados, lavados brevemente em 1 M de HCl, e retornados ao pH 7 através de lavagem extensiva com água destilada.

Processamento Pós Produção

Os derivados de ácido graxo produzidos durante a fermentação

podem ser separadas a partir do meio de fermentação. Qualquer técnica conhecida para separação de derivados de ácido graxo do meio aquoso pode ser utilizada. Um processo de separação exemplar é o processo de separação de duas fases (bifásico). Esse processo envolve a fermentação dos hospedeiros de produção engenheirados geneticamente sob condições suficientes para produzir um derivado de ácido graxo, permitindo ao derivado coletar em uma fase orgânica, e separando a fase orgânica do caldo de fermentação aquoso. Esse método pode ser praticado tanto em configuração de leva ou fermentação contínua.

A separação bifásica leva vantagem na relativa imiscibilidade dos derivados de ácido graxo para facilitar a separação. "Imiscibilidade" se refere a relativa inabilidade de um composto a dissolver em água e é definido e/ou determinado através de coeficiente de partição de compostos. Alguém de habilidade básica na arte irá apreciar que através da escolha de um caldo de fermentação e fase orgânica de modo que o derivado de ácido graxo sendo produzido apresente um alto valor logP, o derivado de ácido graxo irá separar na fase orgânica no recipiente de fermentação, mesmo em concentrações baixas.

Os derivados de ácido graxo produzido de acordo com as composições, vetores, células, e métodos daqui serão relativamente imiscíveis no caldo de fermentação, assim como no citoplasma. Portanto, o derivado de ácido graxo irá coletar em uma fase orgânica intracelularmente e/ou extracelularmente. A coleção dos produtos na fase orgânica irá reduzir o impacto dos derivados de ácido graxo na função celular, e irá permitir ao hospedeiro de produção a produzir uma maior quantidade de produto

por mais tempo.

Os alcoóis graxos, ésteres graxos, ceras, e hidrocarbonos produzidos de acordo com as revelações daqui permitem a produção de compostos homogêneos caracterizados pelo fato de pelo menos por volta de 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, ou 95% dos alcoóis graxos, ésteres graxos, e ceras produzidos de maneira apropriada apresentam comprimentos de cadeia de carbono que variam em menos que por volta de 6, menos que por volta de 4 carbonos, ou menos que por volta de 2 carbonos. Esses compostos podem também ser produzidos de modo que eles apresentam grau de saturação relativamente uniforme, por exemplo, pelo menos por volta de 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, ou 95% dos alcoóis graxos, ésteres graxos, hidrocarbonos e ceras são monoinsaturados, di-insaturados, ou tri-insaturados. Esses compostos podem ser utilizados diretamente como produtos ou componentes de produtos, por exemplo, como combustíveis, detergentes, lubrificantes, aditivos de higiene pessoal, suplementos nutricionais etc. Esses compostos podem também ser utilizados como matéria-prima para reações subsequentes para fazer outros produtos, incluindo, por exemplo transesterificação, hidrogenação, quebra catalítica (*via* hidrogenação, pirólise, ou ambos), ou reações de epoxidação.

Os alcoóis graxos, ésteres graxos, ceras, e hidrocarbonos produzidos de acordo com as composições, vetores, células, e métodos daqui contêm baixos níveis de elementos indesejados, incluindo, porém não limitado a, metais pesados. Em algumas concretizações, os alcoóis graxos, ésteres graxos, ceras, e hidrocarbonos produzidos como descrito aqui contêm de maneira

apropriadas menos que por volta de 50 ppm de arsênico; menos que por volta de 300 ppm de cálcio; menos que por volta de 200 ppm de cloro; menos que por volta de 50 ppm de cobalto; menos que por volta de 50 ppm de cobre; menos que por volta de 300 ppm de ferro; menos que por volta de 2% por peso de água; menos que por volta de 50 ppm de chumbo; menos que por volta de 50 ppm de manganês; menos que por volta de 0,2 ppm de mercúrio; menos que por volta de 50 ppm de molibdênio; menos que por volta de 1% por peso de nitrogênio; menos que por volta de 200 ppm de potássio; menos que por volta de 300 ppm de sódio; menos que por volta de 3% por peso de enxofre; menos que 50 ppm de zinco; e/ou menos que 700 ppm de fósforo.

Em algumas concretizações, os alcoóis graxos, ésteres graxos, ceras, e hidrocarbonos produzidos de acordo com as revelações daqui contêm entre por volta de 50% e por volta de 90% carbono; entre por volta de 5% e por volta de 25% hidrogênio; ou entre por volta de 5% e por volta de 25% oxigênio. Em outras concretizações, os alcoóis graxos, ésteres graxos, ceras, e hidrocarbonos produzidos como descritos aqui contêm entre por volta de 65% e por volta de 85% carbono; entre por volta de 10% e por volta de 15% hidrogênio; ou entre por volta de 10% e por volta de 20% oxigênio.

Composições de Combustível

Como provido aqui, certos derivados de ácido graxo feitos de acordo com os métodos e composições descritos aqui possuem várias características vantajosas para uso como um combustível. Alguém de habilidade básica na arte irá apreciar que, dependendo do propósito pretendido do combustível, diferentes derivados de

ácido graxo podem apresentar vantagens quando comparados a outros derivados de ácido graxo. Por exemplo, derivados de ácido graxo ramificados podem ser mais desejáveis como combustíveis automotivos ou componentes de combustíveis automotivos que tem como intuito a utilização em climas frios. Similarmente, para certas aplicações, pode ser vantajoso produzir um combustível que é tanto mais ou menos oxigenado ou mais ou menos saturado.

Utilizando os métodos descritos aqui, combustíveis contendo derivados de ácido graxo relativamente homogêneos que ao mesmo tempo apresentam as características/qualidades desejadas podem ser produzidos. Tais combustíveis baseados em derivados de ácido graxo podem ser caracterizados através de "fingerprinting" de carbono, e sua falta de impurezas, quando comparado a combustíveis derivados de petróleo ou biodiesel derivado a partir de triglicerídeo, é também vantajosa. Os combustíveis baseados em derivados de ácido graxo podem ser combinados com outros combustíveis ou aditivos de combustíveis para produzir combustíveis apresentando propriedades desejadas.

Os hospedeiros de produção e métodos revelados aqui podem ser utilizados para produzir ácidos graxos livres e ésteres graxos. Em algumas concretizações, os hospedeiros de produção e métodos revelados aqui podem ser utilizados para produzir um titulação ou produtividade aumentada e/ou melhorada de derivados de ácido graxo, incluindo, por exemplo, ácidos graxos livres e/ou ésteres graxos. Em algumas concretizações, a porcentagem de ácidos graxos livres no produto produzido pelo hospedeiro de produção é de pelo menos por volta de 1%, por exemplo, pelo menos por volta de 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, ou

25%. Em algumas concretizações, a porcentagem de ésteres graxos no produto produzido pelo hospedeiro de produção é de pelo menos por volta de 50%, por exemplo, pelo menos por volta de 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, ou 90%. Em algumas concretizações, a proporção de ésteres graxos para ácidos graxos livres no produto produzido pelo hospedeiro de produção é de por volta de 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 5:1, 2:1, ou 1:1. Em certas concretizações, o éster graxo produzido pelo hospedeiro de produção é etil dodecanoato, etil tridecanoato, etil tetradecanoato, etil pentadecanoato, etil *cis*-9-hexadecenoato, etil hexadecanoato, etil heptadecanoato, etil *cis*-11-octadecenoato, etil octadecanoato, ou combinações destes. Em certas outras concretizações, o éster graxo produzido pela produção é metil dodecanoato, metil tridecanoato, metil tetradecanoato, metil pentadecanoato, metil *cis*-9-hexadecenoato, metil hexadecanoato, metil heptadecanoato, metil *cis*-11-octadecenoato, metil octadecanoato, ou combinações destes. Em certas concretizações, o ácido graxo produzido pelo hospedeiro de produção é ácido dodecanóico, ácido tetradecanóico, ácido pentadecanóico, ácido *cis*-9-hexadecenóico, ácido hexadecanóico, ácido *cis*-11-octadecenóico, ou combinações destes.

Os hospedeiros de produção e métodos revelados aqui podem ser utilizados para produzir proporções diferentes de ácidos graxos livres e ésteres graxos. Em algumas concretizações, a proporção de ácidos graxos livres no produto pode ser modificada de acordo com os métodos, composições, vetores e células descritas aqui de modo que a proporção é maior ou menor X os ésteres graxos que são produzidos. Em certas concretizações relacionadas, a proporção de ésteres graxos no produto pode

também ser modificado de acordo com as revelações daqui, de modo que a proporção é maior ou menor X outros produtos, por exemplo, ácidos graxos livres, que são produzidos. Em certas outras concretizações, a produtividade proporcional de derivado de ácido graxo com certos comprimentos de cadeia de carbono pode ser aumentada ou diminuída.

"Fingerprinting" de Carbono

Derivados de ácido graxo produzidos biologicamente representam uma nova fonte de combustíveis, tais como alcoóis, diesel, e gasolina. Biocombustíveis feitos de acordo com os métodos e composições descritas aqui não foram até agora produzidas a partir de fontes renováveis e são novas composições do assunto. Esses novos combustíveis podem ser distinguidos de combustíveis derivados de carbono petroquímico com bases no "fingerprinting" isotópico duplo de carbono. Adicionalmente, a fonte específica de carbono de fonte biológica (*ex.*, glicose X glicerol) pode ser determinada através de "fingerprinting" isotópico duplo de carbono (*veja* U.S. Patent No. 7.169.588, que está incorporada aqui por referência na sua íntegra, em particular, na col. 4, linha 31, a col. 6, linha 8).

Os derivados de ácido graxo e biocombustíveis, químicos, e misturas associadas podem ser distinguidos a partir das seus equivalentes derivado de petróleo com base no ^{14}C (f_M) e "fingerprinting" isotópico duplo de carbono.

Os derivados de ácido graxo descritos aqui têm utilidade na produção de biocombustíveis e químicos. Os novos produtos baseados em derivados de ácido graxo providos pela presente

invenção adicionalmente podem ser distinguidos com base no "fingerprinting" isotópico duplo de carbono daqueles materiais derivados somente de fontes petroquímicas. A habilidade de distinguir esses produtos é beneficial no rastreamento desses materiais no comércio. Por exemplo, combustíveis ou químicos contendo perfis de isótopo de carbono tanto "novo" quanto "velho" podem ser distinguidos de combustíveis e químicos feito apenas de materiais "velhos". Logo, os presentes materiais podem ser seguidos ou "rastreados" no comércio ou identificados no comércio como um biocombustível com base nos seus perfis únicos. Em adição, outros materiais competidores podem ser identificados como sendo derivados biologicamente ou derivados de um fonte petroquímica.

Em alguns exemplos, uma composição de biocombustível é feita, o que inclui um derivado de ácido graxo apresentando $\delta^{13}C$ de desde por volta de -10,9 a por volta de -15,4, caracterizada pelo fato do derivado de ácido graxo ser responsável por pelo menos por volta de 85% do matéria de fonte biológica (*i.e.*, derivado de fontes renováveis tais como, por exemplo, materiais celulósicos e açúcares) na composição. Em outros exemplos, a composição de biocombustível inclui um derivado de ácido graxo apresentando a fórmula:

$$X—(CH(R))_nCH_3$$

Caracterizado pelo fato de

$X = CH_3$, $-CH_2OR^1$; $-C(O)OR^2$; ou $-C(O)NR^3R^4$;

R = para cada n, independentemente ausente, um H, ou um

alifático inferior;

n = um número inteiro desde por volta de 8 a por volta de 34, preferencialmente um número inteiro desde por volta de 10 a por volta de 24;

R^1, R^2, R^3, R^4 = independentemente selecionado a partir de um H ou um alquil inferior.

Tipicamente, quando R é um grupamento alifático inferior, R representa uma porção alquil inferior ou alcenil inferior ramificada, não ramificada ou cíclica. Grupamentos R exemplares incluem, sem limitação, metil, isopropil, isobutil, *sec*-butil, ciclopentenil, e similares. O derivado de ácido graxo é adicionalmente caracterizado como apresentando um $\delta^{13}C$ de desde por volta de -10,9 a por volta de -15,4, e o derivado de ácido graxo é responsável por pelo menos por volta de 85% do material de fonte biológica na composição. Em alguns exemplo o derivado de ácido graxo na composição de biocombustível é caracterizada através da presença de uma fração de carbono moderno (f_M ^{14}C) de pelo menos por volta de 1,003, 1,010, ou 1,5.

Impurezas

Os derivados de ácido graxo preparados de acordo com as revelações daqui são úteis como componentes de ou para fazer biocombustíveis assim como químicos industriais. Esses derivados de ácido graxo são feitos diretamente a partir de ácidos graxos e não a partir de processamento químico de triglicerídeos. De acordo, combustíveis e outros químicos industriais contendo os derivados de ácido graxo revelados geralmente apresentam menos

impurezas do que está normalmente associado com, por exemplo, produtos derivados a partir de triglicerídeos tais como combustíveis de óleos e gorduras vegetais.

Os biocombustíveis brutos de derivado de ácido graxo preparado de acordo com as revelações daqui (antes de misturar o derivado de ácido graxo com outros combustíveis tais como combustíveis baseados em petróleo) contêm menos produtos de catálise de transesterificação do que diesel baseado em petróleo ou outro biodiesel produzido via uma ou mais etapas de transesterificação. O derivado de ácido graxo pode conter menos que por volta de 2,0%, por exemplo, menos que por volta de 1,5%, 1,0%, 0,5%, 0,3%, 0,1%, 0,05%, ou 0% do produto de catálise de transesterificação ou uma impureza resultante de um produto de catálise de transesterificação. Exemplos não limitantes de produtos de catálise de transesterificação incluem produto de catálise de hidróxido, tais como NaOH, KOH, e LiOH; e produtos de catálise ácidos, tais como produtos de catálise ácidos minerais e produtos de catálise de ácido de Lewis. Exemplos não limitantes de produtos de catálise e impurezas resultando de produtos de catálise de transesterificação incluem estanho, chumbo, mercúrio, cádmio, zinco, titânio, zircônio, háfnio, boro, alumínio, fósforo, arsênico, antimônio, bismuto, cálcio, magnésio, estrôncio, urânio, potássio, sódio, lítio, e combinações destes.

Os biocombustíveis brutos de derivado de ácido graxo preparados de acordo com as revelações daqui (antes de misturar os derivados de ácido graxo com um ou mais combustíveis) tendem a apresentar um baixo ponto de gelificação, especialmente quando

o produto de derivado de ácido graxo contém um $C_{16:1}$ etil éster ou um $C_{18:1}$ etil éster, quando comparado aos pontos de gelificação de outros tipos de biocombustíveis.

Similarmente, os biocombustíveis brutos de derivado de ácido graxo preparados de acordo com as revelações daqui (antes de misturar o derivado de ácido graxo com outros combustíveis tais como dieseis baseados em petróleo ou outros biodieseis) contendo menos glicerol (ou glicerina) que biocombustíveis feitos a partir de triglicerídeos. O(s) derivado(s) de ácido graxo contém(êm) menos que por volta de 2,0%, por exemplo, menos que por volta de 1,5%, 1,0%, 0,5%, 0,3%, 0,1%, 0,05%, ou 0% por peso de glicerol.

Biocombustíveis brutos derivados de derivados de ácido graxo aqui também contêm menos álcool(óis) livre(s) (*ex.*, alcoóis que são utilizados para criar um éster) que biodieseis feitos a partir de triglicerídeos. Isso é devido em parte à eficiência de utilização dos alcoóis pelos hospedeiros de produção da presente revelação. Por exemplo, o9s) derivado(s) de ácido graxo pode(m) conter menos que por volta de 2,0%, 1,5%, 1,0%, 0,5%, 0,3%, 0,1%, 0,05%, ou 0% por peso de álcool livre.

Biocombustível derivado a partir de derivados de ácido graxo podem ser adicionalmente caracterizados pela sua baixa concentração de enxofre quando comparado a diesel derivado de petróleo. Biocombustível derivado a partir de derivados de ácido graxo pode apresentar menos que por volta de 2,0%, por exemplo, menos que por volta de 1,5%, 1,0%, 0,5%, 0,3%, 0,1%, 0,05%, ou 0% por peso de enxofre.

Aditivos e Composições de Combustível

Aditivos de combustível são utilizados para melhorar o desempenho de um combustível ou motor. Por exemplo, aditivos de combustível podem ser utilizados para alterar os pontos de congelamento/gelificação, pontos de turvação, lubricidade, viscosidade, estabilidade oxidativa, qualidade de ignição, níveis de octanagem, e pontos de inflamação. Nos Estados Unidos, todos os aditivos de combustível devem ser registrados na Agência de Proteção Ambiental (Environmental Protection Agency). Os nomes de aditivos de combustível e as companhias que vendem os aditivos de combustível estão disponíveis publicamente através de contato com a EPA ou através de busca na página da internet da agência. Alguém de habilidade básica na arte irá apreciar que os derivados de ácido graxo descritos aqui podem ser misturados com um ou mais aditivos de combustível para gerar uma qualidade desejada.

Os derivados de ácido graxo descritos aqui podem ser formulados em aditivos de combustível apropriados, o que aumenta o desempenho de combustíveis ou motores. Por exemplo, os derivados de ácido graxo descritos aqui podem ser formulados em melhoradores de lubricidade, que geram propriedades desejadas tal como proteção contra desgaste das partes do motor. De acordo, composições de aditivos contendo os derivados de ácido graxo produzidos de acordo com as revelações daqui são providas. Em outro exemplo, os derivados de ácido graxo descritos aqui podem ser formulados em inibidores de corrosão.

Os derivados de ácido graxo descritos aqui podem ser misturados com outros combustíveis tais como um ou mais

biodieseis derivados de triglicerídeos, vários alcoóis tais como etanol e butanol, e produtos derivados de petróleo tais como gasolina ou diesel. Sob certas circunstâncias, um derivado de ácido graxo com um baixo ponto de gelificação, tais como um $C_{16:1}$ etil éster ou um $C_{18:1}$ etil éster, é produzido. Esse derivado de ácido graxo de baixo ponto de gelificação pode ser misturado com um ou mais biodieseis feitos de triglicerídeos para reduzir o ponto de gelificação do combustível resultante quando comparado com um combustível contendo somente um ou mais biodieseis feitos de triglicerídeos. Similarmente, um derivado de ácido graxo, tal como um $C_{16:1}$ etil éster ou um $C_{18:1}$ etil éster, podem ser misturados com um diesel derivado de petróleo para prover uma mistura que contém pelo menos por volta de, e frequentemente maior que por volta de, 5% por peso de biodiesel. Em alguns exemplos, a mistura de combustível inclui pelo menos por volta de 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, e 60% por peso de derivado de ácido graxo.

Em algumas concretizações, a composição de combustível pode adicionalmente conter um combustível sintético. Qualquer combustível sintético obtido a partir de carvão, gás natural, ou biomassa pode ser apropriadamente utilizado. Em concretizações adicionais, o combustível sintético contém um combustível baseado em Fischer-Tropsch, um combustível baseado em Bergius, um combustível baseado em Mobil, um combustível baseado em Karrick, ou uma combinação destes. Em concretizações ainda adicionais, o combustível sintético contém um combustível baseado em Carvão-para-Líquidos (combustível baseado em CTL), um combustível baseado em Gás-para-Líquidos (combustível baseado em GTL), um combustível baseado em Biomassa-para-Líquidos

(combustível baseado em BTL), um combustível baseado em Carvão e Biomassa-para-Líquidos (combustível baseado em CBTL), ou uma combinação destes. Em uma concretização exemplar, o combustível sintético contém um combustível baseado em Fischer-Tropsch.

A quantidade de combustível sintético na composição de combustível revelado aqui pode ser desde por volta de 5% a por volta de 90%, desde por volta de 5% a por volta de 80%, desde por volta de 5% a por volta de 70%, desde por volta de 5% a por volta de 60%, ou desde por volta de 5% a por volta de 50%.

Em certas concretizações, uma composição de biocombustível pode ser feita que inclua pelo menos por volta de 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% ou 95% de um derivado de ácido graxo que inclui uma cadeia de carbono que é 8:0, 10:0, 12:0, 14:0, 14:1, 16:0, 16:1, 18:0, 18:1, 18:2, 18:3, 20:0, 20:1, 20:2, 20:3, 22:0, 22:1 ou 22:3. Tais composições de biocombustível podem adicionalmente incluir pelo menos um aditivo selecionado a partir de um aditivo capaz de baixar o ponto de turvação que podem baixar o ponto de turvação para menos que por volta de 5°C, ou menos que por volta de 0°C; um surfactante; uma microemulsão; pelo menos por volta de 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, ou 95% de combustível diesel a partir de triglicerídeos; uma gasolina derivada de petróleo; ou um combustível diesel a partir de petróleo.

Em algumas concretizações, a composição de combustível contendo os ésteres graxos produzidos de acordo com os métodos, vetores, células e composições daqui adicionalmente contêm um ou mais aditivos de combustível diesel. Aditivos apropriados são

desejadamente aqueles que geram desempenho melhorado porém também compatibilidade com os componentes na composição de combustível e dispositivos que são tipicamente associados com motores a diesel. Exemplos ilustrativos de outros aditivos de combustível apropriados incluem melhoradores de ignição ou melhoradores de número de cetano, detergentes, dispersantes, agentes anti-desgaste, modificadores de índice de viscosidade, modificadores de fricção, melhoradores de lubricidade, estabilizadores, antioxidantes, inibidores de corrosão, biocidas, desativadores de metal, e quantidades mínimas de outros aditivos opcionais, incluindo, sem limitação, agentes anti-espuma e fixadores de selagem.

Em concretizações particulares, melhoradores de ignição ou melhoradores de número de cetano são frequentemente adicionados para melhorar o desempenho de motor a diesel. Melhoradores de número de cetano exemplares incluem 2'-etilhexil nitrato, e outros acil nitratos. Melhoradores de número de cetano podem ser adicionados a uma composição de combustível em uma quantidade que é por volta de 0,01 wt.% a por volta de 1,0 wt.%, por exemplo, por volta de 0,05 wt.% a por volta de 0,5 wt.%, baseado no peso total da composição de combustível.

Em certas concretizações, vários detergentes e/ou dispersantes podem ser incluídos na composição de combustível contendo o éster graxo produzido de acordo com as presentes revelações para associar e dispersar ou remover depósitos danosos das partes de motor diesel. Detergentes apropriados tipicamente contêm uma cabeça polar contendo um sal metálico de um composto orgânico ácido e uma longa cauda hidrofóbica.

Detergentes exemplares incluem sais carbonato boratados, sais sulfonato boratados, que são preferencialmente sobrebase. *Veja, ex.*, U.S. Patent Nos. 4.744.920, 4.965.003, as revelações das quais estão incorporadas aqui. Dispersantes exemplares incluem, sem limitação, dispersantes carboxílicos, dispersantes sucinimida, dispersantes amina, e dispersantes Mannich. *Veja, ex.*, U.S. Patent Nos. 3.172.892, 3.438.757, 3.980.569, e 6.165.235, as revelações das quais são incorporadas por referência aqui. Dispersantes podem estar presentes na composição de combustível em uma quantidade de por volta de 0,01 wt.% a por volta de 0,1 wt.%, por exemplo, 0,03 a por volta de 0,05 wt.%, baseado no peso total da composição de combustível.

Em certas concretizações, agentes anti-desgaste, incluindo por exemplo, sais metálicos dihidrocarbil ditiofosfato, podem ser adicionados à composição de combustível para prover benefícios tanto anti-desgaste quanto antioxidantes. *Veja, ex.*, U.S. Patent No. 5.898.023, as revelações das quais estão incorporadas aqui por referência.

Em concretizações particulares, a quantidade de melhorador de lubricidade na composição de combustível pode variar desde por volta de 1 ppm a por volta de 50.000 ppm, por exemplo, por volta de 10 ppm a por volta de 20.000 ppm, ou por volta de 25 ppm a por volta de 10.000 ppm. Exemplos não limitantes de melhoradores de lubricidade incluem ésteres e ácidos graxos, que podem ou não ser o mesmo daqueles produzidos de acordo com os métodos descritos aqui.

Em concretizações particulares, a quantidade de estabilizadores, que melhora a estabilidade de armazenagem da

composição de combustível, pode variar desde por volta de 0,001 wt.% a por volta de 2 wt.%, por exemplo por volta de 0,01 wt.% a por volta de 1 wt.%, baseado no peso total da composição de combustível. Um estabilizador exemplar é uma amina primária acil terciário.

Antioxidantes previnem a formação de depósitos de goma nos componentes do sistema de combustível devido à oxidação dos combustíveis na armazenagem e/ou inibição da formação de compostos de peróxido em certas composições de combustível. A quantidade de antioxidantes pode variar desde por volta de 0,001 wt.% a por volta de 5 wt.%, por exemplo, desde por volta de 0,01 wt.% a por volta de 1 wt.%, baseado no peso total da composição de combustível.

Inibidores de corrosão protegem metais ferrosos nos sistemas de manuseio de combustível, tais como canos e tanques de armazenagem, da corrosão. Certos inibidores de corrosão são também conhecidos por gerar lubricidade adicional, e desse modo são particularmente apropriados quando lubricidade adicional é desejada. O inibidor de corrosão pode estar presente na composição de combustível em uma quantidade de por volta de 0,001 wt.% a por volta de 5 wt.%, por exemplo, desde por volta de 0,01 wt.% a por volta de 1 wt.%, baseado no peso total da composição de combustível.

Biocidas são utilizadas para combater crescimento microbiano na composição de combustível, que pode estar presente na composição de combustível em uma concentração de por volta de 0,001 wt.% a por volta de 5 wt.%, por exemplo, desde por volta de 0,01 wt.% a por volta de 1 wt.%, baseado no peso total da

composição de combustível.

Desativadores de metal suprimem os efeitos catalíticos de alguns metais, particularmente cobre, na oxidação de combustível, o que pode estar presente na composição de combustível em uma quantidade de por volta de 0,001 wt.% a por volta de 5 wt.%, por exemplo, a 0,01 wt.% a por volta de 1 wt.%, baseado no peso total da composição de combustível.

Em adição, melhoradores de viscosidade, que são tipicamente materiais poliméricos de pesos moleculares médio de número de desde por volta de 5.000 a por volta de 250.000, e modificadores de fricção, que são tipicamente compostos organo-molibdênio contendo enxofre podem ser adicionados em pequenas quantidades. Inibidores de espuma, que tipicamente incluem polímeros acil metacrilato ou polímeros dimetil sílica, podem também ser adicionados à composição de combustível em uma quantidade de menos que por volta de 10 ppm. Além disso, fixadores de selagem podem ser adicionados para garantir selagem de elastômero apropriada e prevenir falha de selagem prematura podem ser incluídos na composição de combustível.

EXEMPLOS

Os exemplos que seguem ilustram o engenheiramento de hospedeiros de produção para produzir derivados de ácidos graxos específicos. As vias biossintéticas envolvidas na produção de derivados de ácido graxo estão ilustradas nas figuras.

Por exemplo, **FIG. 2** é um diagrama da via FAS ilustrando as enzimas diretamente envolvidas na síntese de acil-ACP. Para

aumentar a produção de derivados de ácido graxo, tais como ceras, ésteres graxos, alcoóis graxos, e hidrocarbonos, uma ou mais das enzimas descritas lá podem ser super-expressas ou mutadas para reduzir a inibição autógena, com o intuito de aumentar a quantidade de acil-ACP produzido. Adicionalmente, enzimas que metabolizam os intermediários para fazer produtos baseados em ácidos não graxos (*ex.*, reações extras) podem ser funcionalmente deletadas ou atenuadas para aumentar o fluxo de carbono através da via biossintética de ácido graxo (FAS). Nos exemplos abaixo, muitos hospedeiros de produção são descritos que foram modificados para aumentar a produção de ácido graxo.

FIGs. 4 e 5 ilustram via biossintéticas que podem ser engenheiradas para fazer ésteres graxos e alcoóis graxos, respectivamente. A conversão de cada substrato (*ex.*, acetil-CoA, malonil-CoA, acil-ACP, ácido graxo, e acil-CoA) para cada produto (*ex.*, acetil-CoA, malonil-CoA, acil-ACP, ácido graxo, acil-CoA, aldeídos graxos, ésteres graxos, e alcoóis graxos) pode ser alcançada utilizando vários polipeptídeos diferentes que são membros das classes de enzima indicadas.

Os exemplos abaixo descrevem microorganismos que foram engenheirados ou podem ser engenheirados a produzir alcoóis graxos, ésteres graxos, e hidrocarbonos específicos.

EXEMPLO 1. CONSTRUÇÃO DE HOSPEDEIRO DE PRODUÇÃO

Um hospedeiro de produção exemplar é LS9001. LS9001 foi produzido através da modificação C41(DE3) desde super-expressão (Saint Beausine, França) até mutante nulo do gene *fadE* (acil-CoA desidrogenase).

Resumidamente, a cepa mutante nulo de *fadE* de *E. coli* foi preparada utilizando oligos YafV_NotI e Ivry_Ol para amplificar por volta de 830 pb a montante de *fadE* e oligos Lpcaf_ol e LpcaR_Bam para amplificar por volta de 960 pb a jusante de *fadE*. PCR de sobreposição foi utilizado para criar uma construção para deleção em fase do gene *fadE* completo. A construção de deleção de *fadE* foi clonada no plasmídeo sensível a temperatura pKOV3, que contém um gene *sacB* para contra-seleção, e uma deleção cromossomal de *fadE* foi feita de acordo com o método *Link et al.*, J. Bact. 179:6228-6237, 1997. A cepa resultante não foi capaz de degradar ácidos graxos e acil-CoAs graxos. Essa cepa mutante nulo é aqui designada como *E. coli* (DE3, Δ*fadE*).

Outra cepa de deleção *fadE*, MG1655, foi construída de acordo com os procedimentos descritos por *Datsenko et al.*, PNAS(USA), 97:6640-6645 (2000), com as modificações descritas abaixo. Os dois oligos utilizados para criar a deleção foram:

Del-*fadE*-F: 5'-AAAAACAGCAACAATGTGAGCTTTGTTGTAATTATATTGTAAACATATTGATTCCGGGGATCCGTCGACC; (SEQ ID NO:69) e

Del-*fadE*-R: 5'-AAACGGAGCCTTTCGGCTCCGTTATTCATTTACGCGGCTTCAACTTTCCTGTAGGCTGGAGCTGCTTC (SEQ ID NO:70).

Os oligos Del-*fadE*-F e Del-*fadE*-R cada contêm 50 bases de homologia com o gene *fadE* de *E. coli* e foram utilizados para amplificar o cassete de resistência a canamicina a partir do plasmídeo pKD13 através de PCT como descrito. O produto de PCR resultante foi utilizado para transformar células de *E. coli*

MG1655 eletrocompetentes contendo pKD46. As células foram previamente induzidas com arabinose por 3-4 horas como descrito por *Datsenko, supra*. Seguindo 3 horas de crescimento em meio SOC a 37°C, as células foram plaqueadas em placas de ágar Luria contendo 50 µg/mL de canamicina. Colônias resistentes foram isoladas após uma incubação durante a noite a 37°C. Disrupção do gene *fadE* foi confirmada em algumas das colônias através de amplificação por PCR utilizando oligos *fadE*-L2 e *fadE*-R1, que foram desenhados a flanquear o gene *fadE*.

fadE-L2 5'-CGGGCAGGTGCTATGACCAGGAC (SEQ ID NO:71); e

fadE-R1 5'-CGCGGCGTTGACCGGCAGCCTGG (SEQ ID NO:72)

Após a deleção *fadE* apropriada foi confirmada, uma colônia foi utilizada para remover o marcador Km^R utilizando o plasmídeo pCP20. A cepa resultante é designada como MG1655 (Δ*fadE*).

Os hospedeiros com *fadE* deletados foram submetidos para ajustes adicionais. Um plasmídeo carregando os quatro genes que são responsáveis para atividade acetil-CoA carboxilase em *E. coli* (*accA*, *accB*, *accC*, e *accD*, Nºs de Acesso do GenBank: NP_414727, NP_417721, NP_417722, NP_416819, EC 6.4.1.2) foram introduzidos. Os genes *accABCD* foram clonados em duas etapas como operons bicistrônicos nos sítios *NcoI/HindIII* e *NdeI/AvrII* de pACYCDuet-1 (Novagen, Madison, WI, EUA), e o plasmídeo resultante foi designado como pAS004.126. Alternativamente, o hospedeiro de produção foi engenheirado a expressar *accABCD* proveniente de *Lactobacillus plantarum*.

Modificações adicionais que foram incluídas em um

hospedeiro de produção incluem os seguintes: super-expressão de *aceEF* (codificando o componente E1p desidrogenase e o componente E2p dihidrolipoamida aciltransferase dos complexos piruvato e 2-oxoglutarato desidrogenase); e *fabH/fabD/fabG/acpP/fabF* (codificando FAS) proveniente de *E. coli, Nitrosomonas europaea* (ATCC 19718), *Bacillus subtilis, Saccharomyces cerevisiae, Streptomyces spp, Ralstonia, Rhodococcus, Corynebacteria, Brevibacteria, Mycobacteria,* e levedura oleaginosa. Similarmente, hospedeiros de produção foram engenheirados a expressar *accABCD* (codificando acetil CoA carboxilase) proveniente de *Pisum savitum*. Porém, quando o hospedeiro de produção estava também produzindo butanol foi menos desejado expressar o homólogo de *Pisum savitum*.

Em alguns hospedeiros de produção, genes foram eliminados ou atenuados utilizando o método de *Link, et al.*, J. Bacteriol. 179:6228-6237, 1997. Genes que foram eliminados ou atenuados incluíram *gpsA* (codificando sn-glicerol 3-fosfato desidrogenase biossintética, Nº de Acesso do GenBank NP_418065, EC: 1.1.1.94); *ldhA* (codificando lactato desidrogenase, Nº de Acesso do GenBank NP_415898, EC: 1.1.1.28); *pflb* (codificando formato acetiltransferase 1, Nº de Acesso do GenBank P09373, EC: 2.3.1.54); *adhE* (codificando álcool desidrogenase, Nº de Acesso do GenBank CAA47743, EC: 1.1.1.1, 1.2.1.10); *pta* (codificando fosfotransacetilase, Nº de Acesso do GenBank NP_416800, EC: 2.3.1.8); *poxB* (codificando piruvato oxidase, Nº de Acesso do GenBank NP_415392, EC: 1.2.2.2); *ackA* (codificando acetato quinase, Nº de Acesso do GenBank NP_416799, EC: 2.7.2.1), e combinações destes.

Similarmente, a mutação PlsB[D311E] foi introduzida em LS9001 para atenuar *plsB* para a deleção *fadE*. Essa mutação diminui a quantidade de carbono desviada da produção de fosfolipídeo. Um alelo codificando PlsB[D311E] foi feito através da substituição do códon GAC para aspartato 311 por um códon a GAA para glutamato. O alelo alterado foi preparado através de síntese gênica e o alelo selvagem *plsB* cromossomal foi trocado pelo alelo mutante *plsB* [D311E] utilizando o método de *Link et al.* (*veja supra*).

EXEMPLO 2. MODIFICAÇÕES DE HOSPEDEIROS DE PRODUÇÃO

Os seguintes plasmídeos foram construídos para a expressão de várias proteínas que são utilizadas na síntese de derivados de ácido graxo. As construções foram preparadas utilizando métodos padrão de biologia molecular. Todos os genes clonados foram colocados sob o controle de promotores induzidos por IPTG (*ex.*, um promotor T7, um promotor *tac*, ou um promotor *lac*).

O gene '*tesA* (gene da tioesterase A, Nº de Acesso do GenBank NP_415027 sem sequência líder (SEQ ID NO:31) (*Cho* e *Cronan*, J. Biol. Chem., 270:4216-9, 1995, EC: 3.1.1.5, 3.1.2.-)) de *E. coli* foi clonado em um vetor pETDuet-1 digerido com *NdeI/AvrII* (pETDuet-1 descrito aqui está disponível através da Novagen, Madison, WI, EUA). Genes codificando tioesterases (TEs) vegetais do tipo FatB proveniente de *Umbellularia californica*, *Cuphea hookeriana*, e *Cinnamonum camphorum* (Nºs de Acesso do GenBank: UcFatB1=AAA34215, ChFatB2=AAC49269, ChFatB3=AAC72881, CcFatB=AAC49151) foram individualmente clonados em três vetores diferentes: (i) pETDuet-1 digerido com *NdeI/AvrII*; (ii) pBluescript KS+ digerido com *XhoI/HindIII* (Stratagene, La

Jolla, CA, EUA, para criar proteínas de fusão *lacZ*::TE N-terminais); e (iii) pMAL-c2X digerido com *XbaI/HindIII* (New England Lab, Ipswich, MA, EUA) (para criar fusões *malE*::TE N-terminais). O gene *fadD* (codificando acil-CoA sintase) proveniente de *E. coli* foi clonado em um derivado de pCDFDuet-1 digerido com *NcoI/HindIII*, que continha o gene *acr1* (acil-CoA redutase) proveniente de *Acinetobacter baylyi* ADP1 dentro de seus sítios *NdeI/AvrII*.

Tabela 7 provê um resumo dos plasmídeos gerados para fazer vários hospedeiros de produção exemplares.

Tabela 7: Resumo dos plasmídeos utilizados em hospedeiros de produção

Plasmídeo	Organismo Fonte Produto Gênico	Nº de Acesso do GenBank & Número EC
pETDuet-1-'TesA	*coli* 'TesA	Acessos: NP_415027, EC: 3.1.1.5, 3.1.2.-
pETDuet-1-Teuc pBluescript-TEuc pMAL-c2X-TEuc	*Umbellularia californica* UcFatB1	Q41635 AAA34215
pETDuet-1-Tech pBluescript-TEch pMAL-c2X-TEch	*Cuphea hookeriana* ChFatB2 ChFatB3	ABB71581 AAC49269 AAC72881
pETDuet-1-Tecc pBluescript-TEcc Teci	*Cinnamonum camphorum* CcFabB	 AAC49151
pETDuet-1-atFatA3	*Arabidopsis thaliana*	NP_189147
pETDuet-1-HaFatA1	*Helianthus annuus*	AAL769361
pCDFDuet-1-*fadD-acr1*	*E. coli*	*fadD*:Acessos NP_416319, EC 6.2.1.3

Plasmídeo	Organismo Fonte Produto Gênico	Nº de Acesso do GenBank & Número EC
		acr1:Acessos YP_047869
pETDuet-1-'TesA	*coli* 'TesA	Acessos: NP_415027, EC: 3.1.1.5, 3.1.2.-
pETDuet-1-Teuc pBluescript-TEuc pMAL-c2X-TEuc	*Umbellularia californica* UcFatB1	Q41635 AAA34215
pETDuet-1-Tech pBluescript-TEch pMAL-c2X-TEch	*Cuphea hookeriana* ChFatB2 ChFatB3	ABB71581 AAC49269 AAC72881
pETDuet-1-Tecc pBluescript-TEcc Teci	*Cinnamonumcamphorum* CcFatB	 AAC49151
pCDFDuet-1-*fadD*-*acr1*	*E. coli*	*fadD*:Acessos NP_416319, EC 6.2.1.3 *acr1*:Accessions YP_047869

Alguém de habilidade básica na arte irá apreciar que diferentes plasmídeos e modificações genômicas podem ser utilizadas para obter cepas similares.

Os plasmídeos de expressão selecionados continham replicons e marcadores de resistência a antibióticos compatíveis para produzir sistema de expressão de quatro plasmídeos.

Em algumas concretizações, LS9001 pode ser co-transformada com: (i) qualquer um dos plasmídeos expressando TE; (ii) o plasmídeo expressando *fadD*, que também expressa *acr1*; e (iii) plasmídeo de expressão da éster sintase.

Com será claro para alguém com habilidade básica na arte, quando LS9001 é induzido com IPTG, a cepa resultante irá produzir concentrações aumentadas de alcoóis graxos a partir de fontes de carbono tal como glicose.

EXEMPLO 3. PRODUÇÃO DE ÁLCOOL GRAXO NA CEPA RECOMBINANTE DE *E. COLI*

Alcoóis graxos foram produzidos através da expressão de um gene da tioesterase e um gene da acil-CoA redutase exogenamente em um hospedeiro de produção. Mais especificamente, plasmídeos pCDFDuet-1-*fadD-acr1* (acil-CoA redutase) e pETDuet-1-'TesA (tioesterase) foram transformados na cepa de *E. coli* LS9001 e transformantes correspondentes foram selecionados utilizando placas LB suplementado com espectinomicina 100 mg/L e carbenicilina 50 mg/L. Quatro transformantes de LS9001/pCDFDuet-1-*fadD-acr1* foram independentemente inoculados em 3 mL de um meio M9 suplementado com carbenicilina 50 mg/L e espectinomicina 100 mg/L. As amostras contendo os transformantes foram cultivados a 25°C em um agitador (agitando a por volta de 250 rpm) até eles atingirem DO_{600} 0,5. Depois, 1,5 mL de cada amostra foi transferido em um frasco 250 mL contendo 30 mL do meio M9 descrito acima. A cultura resultante foi crescida a 25°C em um agitador até atingir uma DO_{600} entre 0,5-1,0. IPTG foi então adicionada a uma concentração final de 1 mM. O crescimento celular continuou por 40 horas.

As células foram então centrifugadas e precipitadas a 4.000 rpm. O precipitado celular foi suspendido em 1,0 mL de metanol.

3 mL de acetato de etila foi então misturado com as células suspendidas, seguida pela adição de 3 mL de H_2O. Após, a mistura foi sonicada por 20 minutos. A amostra resultante foi centrifugada a 4.000 rpm por 5 minutos. Então a fase orgânica (a fase superior), que continha álcool(óis) graxo(s), foi submetida à análise GC/MS. O álcool total (incluindo tetradecanol, hexadecanol, hexadecenol, e octadecenol) foi titulado em por volta de 1-10 mg/L. Quando uma cepa de *E. coli* carregando somente vetores vazios foi cultivado sob as mesmas condições e seguindo o mesmo protocolo, uma titulação de alcoóis graxos de apenas 0,2-0,5 mg/L foi obtida.

EXEMPLO 4. PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS (FA) E ETIL ÉSTERES DE ÁCIDO GRAXO (FAEE) CONTENDO CADEIAS DE CARBONO DE NÚMERO ÍMPAR SEM METAIS PESADOS

Produção de amostra de biodiesel #23-30

A amostra de biodiesel #23-30 ("amostra #23-30") foi produzida através de cultivo de biorreator de uma cepa de *E. coli* (C41 DE3 Δ*fadE* Δ*fabR* 'TesA *fadD adp1ws*) engenheirada para produzir ésteres graxos. Um protocolo de inóculo em dois estágios foi utilizado para expansão da cultura. O primeiro estágio consistiu na inoculação de 50 mL de meio LB (suplementado com carbenicilina 100 µg/L e espectinomicina 100 µg/L) em um frasco balão de agitação de 250 mL com um 1 mL de ampola estoque congelada de cepa de *E. coli* de produção de éster. Esse frasco de semeadura foi incubado a 37°C por aproximadamente 7 horas (DO_{600} final = 4,5, pH 6,7), após os quais 3 mL da cultura primária foram transferidos para cada um dos três frascos balão de 2 L contendo 350 mL de meio F1 mínimo tamponado que também continha

carbenicilina 100 µg/L e espectinomicina 100 µg/L. O tampão do frasco de agitação utilizado foi Bis-Tris propano em uma concentração final de 200 mM (pH 7,2). Esses frascos de semeadura secundários foram incubadas a 37°C por aproximadamente 18 horas (DO_{600} final = 12, pH 5,5) e os conteúdos foram utilizados para inocular três biorreatores de 14 L com um volume inicial de 6,5 litros de meio F1 mínimo tamponado seguindo de inoculação. Esses biorreatores também contêm carbenicilina 100 µg/L e espectinomicina 100 g/L.

Esses biorreatores de 14 L foram inicialmente cultivados a 37°C, e os níveis de oxigênio dissolvido foram mantidos a 30% de saturação, utilizando a agitação e as voltas de cascata de enriquecimento de oxigênio. O pH da mistura de fermentação foi mantido a 7,2, utilizando H_2SO_4 1 M e gás amônia anidro. Uma alimentação de nutrientes consistindo primariamente de 43% (w/v) de glicose foi iniciada em cada biorreator quando a carga original de glicose 5 g/L no meio basal foi exaurida. A taxa de alimentação de solução de glicose foi então manualmente ajustada para a duração da corrida de fermentação para manter a glicose residual a um valor baixo (porém não zero) pela duração da corrida de fermentação. Culturas foram induzidas com uma concentração final de IPTG 1 mM quando a DO_{600} das culturas atingiu 30. Nesse ponto de indução, a temperatura de cultivo de biorreator foi reduzido para 30°C, e por volta de 15 mL/L (em uma base de volume de 6,5 a 7-Litros) de etanol foi adicionado à cultura e monitorada através de HPLC ao longo do experimento. Etanol adicional foi adicionado periodicamente aos biorreatores para manter as concentrações residuais em por volta de 20 mL/L. Os conteúdos dos biorreatores foram coletados após por volta de

60 horas de cultivo, com por volta de 10 L do caldo coletado de cada um dos três biorreatores.

Esses caldos coletados foram combinados e extraídos com um volume equivalente de acetato de etila sendo misturados a temperatura ambiente por duas horas. Os extratos de caldo foram então centrifugados (3.500 rpm, 30 minutos) para separar as camadas líquidas, seguido pela remoção da camada orgânica para processamento adicional. Acetato de etila foi quase completamente removido (<0,3% de resíduo, como determinado através de GC/FID) da camada orgânica utilizando evaporação rotatória (Büchi, R-200), deixando por volta de 90 mL de um líquido escuro, oleoso. Esse líquido foi referido como amostra #23-30.

Quantificação de FA e FAEE na amostra #23-30

GC-MS foi desempenhada utilizando sistema Agilent 5975B MSD equipado com uma coluna DB-5 de 30 m × 0,25 mm (filme de 0,10 µm). A temperatura da coluna foi de isotérmico de 3 minutos a 100°C. A temperatura foi programada a subir de 100°C a 320°C a uma taxa de 20°C/min. Quando a temperatura final de 320°C foi alcançada, a coluna se manteve isotérmica por 5 minutos naquela temperatura. O volume de injeção foi de 1 µL. O gás carreador, hélio, foi liberado a 1,3 mL/min. O espectrômetro de massa foi equipado com uma fonte de ionização de impacto de elétrons. A temperatura da fonte de ionização foi ajustada para 300°C. Padrões de FAEE (*ex.*, etil dodecanoato, etil tetradecanoato, etil *cis*-9-hexadecenoato, etil hexadecanoato, etil octadecanoato, todos >99%); padrões de metil éster de ácido graxo (FAME) (*ex.*, metil dodecanoato, metil tetradecanoato, metil

pentadecanoato, metil *cis*-9-hexadecenoato, metil hexadecanoato, metil *cis*-11-octadecenoato, todos >99%); trimetilsilildiazometano (TMSD, 2 M em hexano); ácido hidroclorídrico (37%); metanol (>99,9%); e acetato de etila (>99,9%) quando comprados da Sigma-Aldrich e aplicados sem purificação prévia.

A amostra #23-30 foi derivatizada através da adição de 50 µL de trimetilsilildiazometano (TMSD), 8 µl de HCl, e 36 µl de metanol a 1 mL de amostra (1 mg/mL em acetato de etila). A mistura foi incubada a temperatura ambiente por 1 hora.

Antes da quantificação, o FAEE e FAME em amostra #23-30 foram identificadas utilizando dois métodos. Primeiro, o tempo de retenção GC de cada composto foi comparado ao tempo de retenção de um padrão conhecido. segundo, identificação de cada composto foi confirmado através da comparação do espectro de massa do composto com um espectro de massa do padrão na biblioteca de espectros de massa.

Quando um padrão para um FAEE ou FAME estava disponível, a quantificação do FAEE ou FAME foi determinado através da geração de uma curva de calibração (concentração X resposta do instrumento). Uma relação linear entre a resposta do instrumento e a concentração do analito foi então obtida. A concentração do composto na amostra foi determinada através da obtenção sua reposta de instrumento e referenciando à curva de calibração.

Quando um padrão para um FAEE não estava disponível, uma resposta média de instrumento foi utilizada para determinar as concentrações de composto. Foi tirada uma média da inclinação e

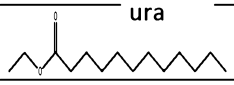
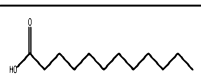
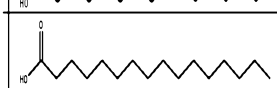
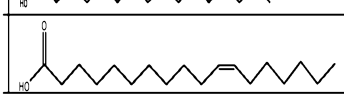
interseção para todas as curvas de calibração existentes. A partir dessas médias, uma relação linear entre concentrações e resposta do instrumento foi determinada. As concentrações de compostos desconhecidos foram então determinadas através de referência das respostas de instrumento com a relação linear entre resposta de instrumento e concentração utilizando **Equação 1.**

Equação 1: concentração = (resposta de instrumento - interseção média)/inclinação média

Após identificação e quantificação do FAME, a concentração dos ácidos graxos livres associados foi determinada baseado na concentração de FAME e a proporção de peso molecular de FA para FAME. Finalmente, a concentração de FAEE e FA em mg/L foi convertida em porcentagem na amostra de biodiesel (w/w %).

As concentrações de FAEE e FA na amostra #23-30 são listadas na **Tabela 8.** A concentração total de FAEEs e FAs foi de 80,7%. O resto dos compostos desconhecidos pode ser analisado através do método LC/MS/MS. Etil pentadecanoato, etil *cis*-9-hexadecenoato, etil hexadecanoato e etil *cis*-11-octadecenoato foram os componentes principais da amostra #23-30.

Tabela 8: Porcentagem de FAEE e FA na amostra #23-30

Nome	Estrutura	PM	Porcentagem %
Etil dodecanoa		228,2	1,82 ± 0,03
Etil tridecanoa		242,2	0,16 ± 0,01
Etil tetradecan		256,2	12,88 + 0.16
Etil pentadecano		270,3	0,62 ± 0,02
Etil cis-9-hexadecenoato		282,3	24,12 ± 0,20
Etil hexadecano		284,3	9,04 ± 0,11
Etil heptadecano		298,3	0,11 ± 0,01
Etil cis-11-octadecenoato		310,3	23,09 ± 0,33
Etil octadecanoa		312,3	0,19 ± 0,02
Ácido dodecanóico		200,2	0,94 ± 0,02
Ácido tetradecanói		228,2	2,63 ± 0,03
Ácido pentadecanó		242,2	0,10 ± 0,01
Ácido cis-9-hexadecanóico		254,2	1,97 ± 0,01
Ácido hexadecanóico		256,2	1,01 ± 0,01
Ácido cis-11-octadecanóico		282,3	2,00 ± 0,02

*Porcentagem é w/w %.

Surpreendentemente, amostra #23-30 continha FA e FAEE de número ímpar.

Análise de elementos quantitativa de amostra #23-30

Metais pesados são conhecidos por contaminar os produtos de catálise utilizados na quebra catalítica. Para medir os níveis de metais pesados na amostra #23-30, amostra #23-30 foi enviada

para Galbraith Laboratories, Inc., para análise de elementos quantitativa de arsênico, cálcio, carbono, cloro, cobalto, cobre, hidrogênio, ferro, água de Karl Fisher, chumbo, manganês, magnésio, mercúrio, molibdênio, nitrogênio, potássio, sódio, enxofre, zinco, oxigênio, e fósforo. Métodos preparatórios e analíticos são descritos abaixo. Resultados são mostrados na **Tabela 9**. Todas as quantidades na **Tabela 9** estavam abaixo do nível de quantificação (LOQ) exceto para carbono (73,38%), cloro (91 ppm), hidrogênio (12,1%), água de Karl Fisher (0,998%), mercúrio (0,057 ppm), oxigênio (14,53%), e fósforo (343 ppm). Portanto, amostra #23-30 não continha altos níveis de metais pesados em questão.

Método G-52, Rev 6: Digestão em micro-ondas de amostras para análise de metais

Uma quantidade apropriada de amostra foi pesada em um frasco para micro-ondas próximo a 0,001 g. Os reagentes apropriados foram então adicionados ao frasco para micro-ondas. Se uma reação visível foi observada a reação foi permitida a cessar antes de se tampar o frasco. O frasco foi então selado e colocado no micro-ondas de acordo com as instruções do fabricante. A temperatura de cada frasco atingiu um mínimo de 180 ± 10°C em 5 minutos. Ele foi mantido a um mínimo de 180 ± 10°C por 10 minutos. No final do programa de micro-ondas os frascos foram permitidos a resfriar por um mínimo de 5 minutos antes da remoção. Os frascos foram então destampados e transferidos para frascos volumétricos para análise por técnico apropriado.

Método G-55, Rev 3: Combustão de bomba de oxigênio Parr para a determinação de halógenos

Amostras foram pesadas em um copo de combustão, e óleo mineral foi adicionado com um auxiliar de combustão. Para medições de cloro (Cl) e bromo (Br), solução de peróxido de hidrogênio 1% foi adicionada na bomba. Para medições de enxofre (S), uma solução de hidróxido de sódio 0,01 N foi adicionada. A amostra e copo foram selados em uma bomba de combustão de oxigênio Parr juntamente com uma solução de absorção apropriada. A bomba foi purgada com oxigênio, então pressurizada a uma pressão de oxigênio de 25-30 atm, e foi dada a ignição. Depois, os conteúdos da bomba foram bem misturados e transferidos para um beaker para análises subsequentes.

Método G-30B, Rev 7: Digestão de cinza úmida de compostos inorgânicos e orgânicos para análise de metais

A amostra foi queimada utilizando H_2SO_4. Quando analisando para metais que formam sulfatos insolúveis, $HClO_4$ e HNO_3 foram utilizados para queimar o material orgânico. Após queima da amostra, HNO_3 foi adicionada e a amostra foi ressuspendida para solubilizar os metais presentes. Quando a solução se tornou turva, HCl foi adicionado para auxiliar na completa digestão. HF pode ser utilizado quando silício estava presente na amostra porém somente se silício não era um analito de interesse. Todos HF utilizados foram restritos a frascos de Teflon. O produto de digestão translúcido foi quantitativamente transferido para uma frasco volumétrico Classe A e completado ao volume final. A amostra foi então analisada.

Método ME-4A Rev 2: Determinação de ânions suprimidos através de cromatografia de íon

Instrumento	Dionex Model DX500
Coluna de Cromatografia	Dionex IonPac AS9-SC 4 x 250 mm
Eluente Na_2CO_3 2.4 mM	$NaHCO_3$ 1,8 mM
Preparação	Amostras aquosas podem ser analisadas sem preparação. Amostras solúveis em água são tipicamente transferidas por peso para um volume conhecido. Outros materiais sólidos que não são solúveis em água podem ser extraídos para determinar quantidades capazes de ser extraídas de vários ânions ou sofrer combustão para determinar quantidades totais de um elemento tais como Cl ou Br.
Calibração	Padrões para concentração de amostra nos colchetes. 0,2 mg/L – 4,0 mg/L
Introdução da Amostra	Auto injeção (Hitachi Model AS7200)
Determinação	Detecção de condutividade/regressão linear
Limite de quantificação	Geralmente 0,2 mg/L em solução.
Interferências	Ânions com tempo de retenção similares; picos sobrepostos dos principais ânions constituintes.

Método S-300 Rev 7: Determinação de água através de titulação coulométrica (Karl Fischer)

Esse método combina coulometria com a titulação de Karl Fischer. A amostra foi misturada com uma mistura de amino-metanol contendo predominantemente íon iodo (I-) e dióxido de enxofre.

O iodo produzido no anodo através de eletrólise foi permitido a reagir com água. Em tais casos, iodo foi produzido em proporção direta com a quantidade de eletricidade de acordo com a Lei de Faraday. Também, devido ao fato de 1 mole de água reagir estequiometricamente com 1 mole de iodo, 1 mg de água foi equivalente a 10,71 coulombs de eletricidade. Utilizando esse princípio, o Moisture Meter determinou a quantidade de água diretamente do número de coulocombs requeridos para a eletrólise. Esse procedimento inclui tanto introdução direta e uma técnica de pré-tratamento de vaporizador.

Preparação	Pesar para obter 100 µg a 3 mg de H2O; Proteger Amostras de umidade atmosférica durante pesagem e transferência.
Instrumento	Mitsubishi Moisture Meter MCl Model CA-06 (Inst. #569) Mitsubishi Moisture Vaporizer, Model CA/VA-06 (Inst. #568)
Controle	Monoidrato tartrato de sódio (15,66%); Frequência: a cada 10 amostras, um a cada dia no mínimo, 95-105% de recuperação
Introdução de amostra	Porta de entrada, Transferência direta; capilar, seringa, ou concha B. Fornalha, cápsulas de estanho (Water Vaporizer VA-06); Temperatura varia, 200°C é o valor padrão utilizado para padrões. Maioria das amostras analisadas a 160°C. Outras temperaturas mediante solicitação.
Determinação	Titulação coulométrica de reagente Karl Fischer via

	titulador automático		
Limite de Quantificação	100 µg de H_2O		
Precisão & Acurácia	RSD	RE	INSTR#
	1,35%	-0,54%	569
Monidrato Tartrato de Sódio	1,34%	-2,13%	568
Equações	($2I^- - 2e^- \rightarrow I_2$); ($I_2 + SO_2 + 3C_5H_5N + H_2O \rightarrow 2C_5H_5N$ HI + C_5H_5N SO_3)		
	µg H_2O / spl wt (g) = ppm H_2O		
	µgH_2O x 0,1 / spl wt (mg) = % H_2)		
Interferências	(transferência direta somente) álcali livre; agente oxidador, redutor; mercaptanos		

Método E16-2, rev 9 (Traço E16-2A): Determinação de enxofre utilizando LECO SC-432DR

O SC-432DR Sulfur Analyzer é um instrumento de infravermelho não dispersivo, controlado digitalmente desenhado para medir o conteúdo de enxofre em uma variedade de materiais orgânicos e inorgânicos. A amostra sofreu combustão a 1350 ± 50°C em uma atmosfera de oxigênio puro. O enxofre foi oxidado a dióxido de enxofre e quantificado através de absorção de infravermelho. O SC-432DR foi equipado com dois detectores, uma célula infravermelha de alta abrangência e uma de baixa abrangência.

Instrumento	LECO SC-432DR Sulfur Analyzer	
Introdução da Amostra	Pesar amostra em aproximadamente 0,01 mg. Pesar amostras diretamente em recipiente de pesagem tarado em balança eletrônica. Peso automaticamente transferido para banco de dados SC432. Cobrir amostra com acelerador de combustão LECO Com-Cat como requisitado para tipo de amostra.	
Calibração	Três condicionadores de cisteína 5-10 mg. Sete padrões de calibração de 30-175 mg de NIST SRM 8415 Whole Egg Powder (0,512% S). Calibração interna utilizando uma curva regressiva quadrática.	
Controle	NIST SRM 1549 Milk Powder (0,351%); outros para combinar tipo de amostra. Frequência: um para cada dez amostras.	
Determinação	Combustão de O_2 atmosférico a 1350°C. Determinação de SO_2 resultante através de detector de infravermelho.	
Limite de Quantificação	0,08 mg S	
Cálculos	Internos	
Precisão & Acurácia (leite em pó)	RSD (%) 2,60	Recuperação de Média (%) 97,97

Método ME-2, Rev 14: Determinação de carbono, hidrogênio, e nitrogênio

Esse instrumento queima amostra em oxigênio puro a 950°C sob condições estáticas para produzir produtos de combustão de CO_2, H_2O, e N_2. O PE-240 automaticamente analisa esses produtos em um analisador auto-integrante, de condutividade termal em estado de equilíbrio. Anidrido de tungstênio pode ser adicionado para auxiliar na combustão. Um tempo de combustão estendido (*ex.*, modo "burn hard") pode ser empregado em amostras de difícil combustão.

Instrumento	PerkinElmer 240 Elemental Analyzer (Instrument # 409, 410)
Introdução da Amostra	Pesar 1,0-2,5 mg em cápsula de Al capsule; frisar (*Veja* Procedimento GLI G-6) para líquidos; lavado com solvente antes de pesar se requisitado
Decomposição	Combustão a ≥950°C, redução a ≥675°C = CO_2, H_2O, N_2
Calibração	Ciclohexanona-2,4-dinitrofeilhidrazona (1-2,5 mg)
Controle	s-1409, 2-1410: Ciclohexanona-2,4-dinitrofeilhidrazona (51,79% C, 5,07% H, 20,14% N)
Determinação	CO_2, H_2O, N_2 através de analisador de condutividade termal
Quantificação	0,5% C, 0,5% H, 0,5% N

Precisão & Acurácia	Instrument #409			Instrument #410		
	C	H	N	C	H	N
RSD%	0.28	1026	0.39	0.35	1.12	0.41
Recuperação média (%)	99.94	101.25	99.86	100.13	100.40	100.04
Interferências	Metais e alguns halógenos causam combustão incompleta. Auxiliares de combustão e/ou um tempo de combustão estendido podem ser utilizados para aliviar esse problema.					
Cálculos	Instrumento calcula e imprime resultados w/w para %C, %H, e %N. Para amostras frisadas em uma cápsula de alumínio, o %N é corrigido com um fator; (µV/µg amostra/K) x 100 = % Elemento, onde K = calibração = µV/µg de C, ou H, ou N					

Método ME-70, Rev 4: Espectrometria de emissão atômica de plasma induzivelmente acoplada

Esse método descreve determinações multi-elementares através de ICP-AES utilizando sistemas óticos simultâneos e observação axial ou radial do plasma. O instrumento mede os espectros característicos através de espectrometria ótica. Amostras foram nebulizadas e o aerossol resultante foi transportado para a tocha de plasma. Espectro de emissão específico de elemento foram produzidos através de plasma induzivelmente acoplado de radio frequência. Os espectros foram dispersos através de um espectofotômetro de grade, e as

intensidades das linhas de emissão foram monitoradas através de dispositivos fotossensíveis. Correção de ruído foi requerida para determinação de elemento de traço. O ruído foi medido para linhas de analitos em amostras durante a análise. A posição selecionada para a medição de intensidade de ruído, em qualquer um ou ambos os lados da linha analítica, foi determinada através da complexidade do espectro adjacente à linha do analito. Em um modo de análise, a posição utilizada deveria ser o mais livre possível de interferência de espectro e deveria refletir a mesma mudança em intensidade de ruído como ocorre no comprimento de onda do analito medida. Correção de ruído não é requerida em casos de alargamento de linha onde a medição de correção de ruído seria na verdade degradar o resultado analítico.

Instrumento	ICP-OES Optima 5300, 3300DV e 4300DV, ou equivalente
Decomposição	Antes da análise, amostras devem ser acidificadas ou digeridas utilizando Métodos de Preparação de Amostra apropriados.
Calibração	0,01 ppm - 60 ppm mais calibrações específicas de matriz
Introdução da Amostra	Bomba peristáltica, nebulizador de fluxo cruzado, nebulizador GemCone, câmara de spray tipo Scott da Ryton e câmara de spray ciclônico de quartzo
Determinação	Emissão atômica através de plasma de radio frequência induzivelmente acoplado de espectros de emissão específico de elemento através de espectrofotômetro de grade monitorado por dispositivos fotossensíveis.
Limite de Quantificação	Específico de elemento e calibração variando de 0,01-2 ppm
Precisão &	± 10% RSD

Acurácia	
Interferências	De espectro, química, física, memória
Cálculos	wt % = (*fc* × *v*/10 × *D*)/*spl* ppm = (*fc* × *v* × *D*)/*SPL* Onde *fc* = concentração final em µg/mL; *v* = volume de amostra em mL; *D* = fator de diluição; *spl* = massa de amostra em mg; *SPL* = massa de amostra em g

Método E80-2, Rev 4: Determinação de mercúrio (técnica de vapor frio automatizada)

Esse procedimento é baseado em EPA SW846 Método 7471A. Absorção Atômica de Vapor Frio é baseada na teoria geral de absorção atômica, que acredita que átomos livres do analito absorve energia a partir de uma fonte de lâmpada que é proporcional à concentração do analito. Através da utilização de uma lâmpada contendo o metal a ser medido, o comprimento de onda exato necessário para absorção foi produzido e interferências foram fortemente reduzidas. Absorção Atômica de Vapor Frio utiliza esse princípio, e os átomos de mercúrio foram liberados através da redução de íons de mercúrio com Cloreto de Estanho (II) ($SnCl_2$). Gás de nitrogênio carregou os átomos através de uma célula ótica, com a lâmpada de Hg em uma extremidade e o detector na outra extremidade. Devido ao fato do método de vapor frio ter sido empregado, ao invés de um método de chama, compostos orgânicos não digeridos foi uma preocupação de interferência, devido as suas amplas bandas de comprimento de onde da absorção.

Instrumento	PerkinElmer FIMS 400 Automated Mercury Analyzer ou equivalente	
Decomposição	Variável, geralmente digestão de micro-ondas ou digestão em banho de água quente de permanganato	
Calibração	0,1 - 5,0 µg/L	
Introdução da Amostra	Coletor de amostra automatizado, bomba peristáltica	
Determinação	Comprimento de onda primário 253,7 nm, utilizando um detector de estado sólido	
Limite de Detecção	Varia com o método de preparação e matriz de amostra	
Precisão & Acurácia RE RSD	Para digestão em micro-ondas: -2,47% 7,48%	Para digestão com MnO_4^-: 4,90% 5,20%
Interferências	Compostos orgânicos não digeridos	
Cálculos	$\text{ppb Hg} = \frac{\text{µg/L em solução x volume (mL) x fator de diluição}}{\text{peso de amostra (g)}}$	

Tabela 9: Análise quantitativa de elementos da amostra #23-30

Elemento	Método de Preparação	Método Analítico	Resultado
Arsênico	G-52	ME-70	<25 ppm
Cálcio	G-30B	ME-70	<119 ppm
Carbono	N/A	ME-2	73,38%

Cloro	G-55	ME-4ª	91 ppm
Cobalto	G-30B	ME-70	<23 ppm
Cobre	G-30B	ME-70	<23 ppm
Hidrogênio	N/A	ME-2	12,1%
Ferro	G-30B	ME-70	<136 ppm
Água Karl Fisher	N/A	S-300	0,998%
Chumbo	G-52	ME-70	<25 ppm
Manganês	G-30B	ME-70	<23 ppm
Magnésio	G-30B	ME-70	<23 ppm
Mercúrio	G-52	E80-2	0,057 ppm
Molibdênio	G-30B	ME-70	<23 ppm
Nitrogênio	N/A	ME-2	< 0,5%
Potássio	G-30B	ME-70	<103 ppm
Sódio	G-30B	ME-70	<140 ppm
Enxofre	N/A	E16-2ª	<0,140%
Zinco	G-30B	ME-70	<23 ppm
Oxigênio	N/A	Subtração*	14,53%
Fósforo	G-30B	ME-70	343 ppm

Resultados apresentados como "<" estão abaixo do LOQ. * Conteúdo de oxigênio foi determinado através da subtração dos resultados observados para todos os outros elementos a partir de 100%.

EXEMPLO 5. PRODUÇÃO E LIBERAÇÃO DE ÁLCOOL GRAXO A PARTIR DE HOSPEDEIRO DE PRODUÇÃO

acr1 (codificando uma acil-CoA redutase) foi expressa em *E. coli* cultivada com glicose como a única fonte de carbono e energia. A *E. coli* produziu pequenas quantidades de alcoóis graxos tais como dodecanol ($C_{12:0}$-OH), tetradecanol ($C_{14:0}$-OH), e hexadecanol ($C_{16:0}$-OH). Em outras amostras, *FadD* (acil-CoA sintase) foi expressa junto com *acr1* em *E. coli*. Um aumento de cinco vezes na produção de álcool graxo foi observada.

Em outras amostras, *acr1*, *fadD*, e *accABCD* (acetil-CoA carboxilase), em um plasmídeo carregando *accABCD* construído como

descrito no EXEMPLO 1, foram expressos juntamente com várias tioesterases individuais (TEs) em *E. coli* C41 (DE3) selvagem e uma *E. coli* C41 (DE3 Δ*fadE,* uma cepa sem acil-CoA desidrogenase). Isso resultou em aumentos adicionais na produção de álcool graxo e modulação dos perfis de alcoóis graxos (*veja* **FIG. 5**). Por exemplo, super-expressão de *E. coli* $^{'TesA}$ (pETDuet-1-'TesA) nesse sistema atingiu um aumento de por volta de 60 vezes em $C_{12:0}$-OH, $C_{14:0}$-OH e $C_{16:0}$-OH, com $C_{14:0}$-OH sendo o álcool graxo majoritário. Um resultado muito similar foi obtido quando a enzima ChFatB3 (FatB3 proveniente de *Cuphea hookeriana* em pMAL-c2X-TEcu) foi expressa. Quando a enzima UcFatB1 (FatB1 proveniente de *Umbellularia californicain* em pMAL-c2X-TEuc) foi expressa, a produção de álcool graxo aumentou em por volta de 20 vezes e $C_{12:0}$-OH foi o álcool graxo predominante.

Expressão de ChFatB3 e UcFatB1 também levou à produção de quantidades significativas dos alcoóis graxos insaturados $C_{16:1}$-OH e $C_{14:1}$-OH, respectivamente. Alcoóis graxos foram também encontrados no sobrenadante de amostras geradas a partir da expressão de *'tesA*. A 37°C, por volta de quantidades iguais de alcoóis graxos foram encontrados no sobrenadante e no precipitado celular. Enquanto a 25°C, por volta de 25% dos alcoóis graxos foi encontrado no sobrenadante. *Veja* **FIG. 6.**

EXEMPLO 6. PRODUÇÃO DE ÁLCOOL GRAXO UTILIZANDO UMA VARIEDADE DE ACIL-COA REDUTASES

Esse exemplo descreve produção de álcool graxo utilizando uma variedade de acil-CoA redutases. Alcoóis graxos podem ser o produto final. Alternativamente, as células de hospedeiro de produção podem ser engenheiradas a expressar/super-expressar

adicionalmente éster sintases para produzir ésteres graxos.

Cada um dos quatro genes codificando acil-CoA graxo redutases (**Tabela 10**) provenientes de várias fontes foram otimizados em relação ao códon para expressão em *E. coli* e sintetizados pela Codon Devices, Inc. (Cambridge, MA, EUA). Cada um dos genes sintetizados foi clonado como um fragmento *NdeI-AvrII* no vetor pCDFDuet-1-*fadD* (descrito no Exemplo 2). Cada um dos plasmídeos carregando esses genes de acil-CoA redutase com o gene *fadD* de *E. coli* foi transformado na cepa de *E. coli* cepa C41 (DE) (obtido da Over-expression).

As cepas recombinantes foram cultivadas em 3 mL de um caldo LB (suplementado com espectinomicina 100 mg/L) a 37°C durante a noite. 0,3 mL da cultura crescida durante a noite foi transferida para 30 mL de um meio M9 fresco (contendo espectinomicina 100 mg/L) e cultivada a 25°C. Quando as culturas atingiram DO_{600} de 0,5, 1 mM de IPTG foi adicionado. Cada cultura foi alimentada com 0,1% de um dos três ácidos graxos dissolvidos em H_2O a pH 7,0. Os três ácidos graxos alimentados foram dodecanoato de sódio, miristato de sódio, ou palmitato de sódio. Uma cultura sem a adição de ácido graxo foi também incluída como um controle. Após indução, as culturas foram permitidas a crescer na mesma temperatura por 40 horas adicionais a 25°C.

A quantificação de produtividade de ácido graxo ao final da fermentação foi desempenhada utilizando GC-MS como descrito no EXEMPLO 3 e/ou EXEMPLO 4. O álcool graxo resultante produzido a partir do ácido graxo correspondente é mostrado na **Tabela 11.** Os resultados indicaram que três acil-CoA redutases - Acr1, AcrM, e BmFAR - foram capazes de converter todos os três ácidos graxos

em alcoóis graxos correspondentes. Os resultados também indicaram que hFAR e JjFAR apresentaram atividade quando miristato e palmitato eram o substrato. Porém, não houve ou houve pouca atividade quando dodecanoato era o substrato. mFAR1 e mFAR2 somente demonstraram pequena atividade com miristato e não demonstraram atividade com os outros dois ácidos graxos.

Tabela 10: Acil-CoA redutases

Acil-CoA redutase	Número Identidade de Acesso da Proteína	Fontes de Proteína
mFAR1	AAH07178	*Mus musculus*
mFAR2	AAH55759	*Mus musculus*
JjFAR	AAD38039	*Simmondsia chinensis*
BmFAR	BAC79425	*Bombyx mori*
Acr1	AAC45217	*Acinetobacter baylyi ADP1*
AcrM	BAB85476	*Acinetobacter sp. M1*
hFAR	AAT42129	*Homo sapiens*

Tabela 11: Produção de álcool graxo

coli C41(DE3)	Genes Acil-CoA Redutase	Área de Pico[c] Dodecanoato /dodecanol[b]	Miristato /tetradecanol[b]	Palmitato /hexadecanol[b]	Sem suplemento de ácido graxo[a] /hexadecanol
	mFAR1	7.400	85.700	8.465	70.900
	mFAR2	2.900	14.100	32.500	25.800
	JjFAR	5.200	8.500	53.112	33.800
	BmFAR	35.800	409.000	407.000	48.770
	acr1	202.000	495.000	1.123.700	58.515
	acrM	42.500	189.000	112.448	36.854
	hFAR1	5.050	59.500	109.400	94.400
controle do vetor		4.000	1.483	32.700	27.500

controle do meio	10.700	1.500	25.700	25.000

Nota: [a] Somente hexadecanol foi quantificada nesse caso. [b] Ácido graxo alimentado/álcool graxo produzido. [c] A área de pico do álcool graxo produzido.

EXEMPLO 7. ÉSTERES GRAXOS DE CADEIA MÉDIA

Álcool acetil transferases (AATs, EC 2.3.1.84), que são responsáveis pela produção de acetato de acila em várias plantas, pode ser utilizada para produzir ésteres graxos de comprimento de cadeia médio, tais como octanoato de octila, decil octanoato, decil decanoato, e similares. Ésteres graxos, sintetizados a partir de álcool de cadeia média (tal como C_6 e C_8) e acil-CoA ou ácidos graxos de cadeia média (tal como C_6 e C_8) apresentam pontos de derretimento relativamente baixos. Por exemplo, hexil hexanoato apresenta um ponto de derretimento de por volta de -55°C e octanoato de octila apresente um ponto de derretimento de por volta de -18°C a por volta de -17°C. Os baixos pontos de derretimento desses compostos os tornam apropriados para uso como biocombustíveis.

Nesse exemplo, um gene *SAAT* codificando uma tioesterase foi co-expresso em um hospedeiro de produção *E. coli* C41(DE3, Δ*fadE*) (como descrito em International Application No. PCT/US08/058788, as revelações das quais estão incorporadas aqui por referência) com *fadD* proveniente e *E. coli* e *acr1* (álcool redutase proveniente de *A. baylyi* ADP1). Ácido octanóico foi provido no caldo de fermentação. Isso resultou na produção de octanoato de octila. Similarmente, quando e o gene da éster sintase proveniente de *A. baylyi* ADP1 foi expresso no hospedeiro de

produção ao invés do gene *SAAT*, octanoato de octila foi produzido.

Um gene recombinante *SAAT* foi sintetizado pela DNA 2.0 (Menlo Park, CA 94025, EUA). A sequência de DNA sintetizada foi baseada na sequência gênica publicada (Nº de Acesso do GenBank AF193789), porém modificada para eliminar o sítio *Nco*I. O gene *SAAT* sintetizado (como um fragmento *Bam*HI-*Hind*III) foi clonado em pRSET B (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA), linearizado com *Bam*HI e *Hind*III. O plasmídeo resultante, pHZ1.63A foi co-transformado em uma *E. coli* hospedeira de produção com pAS004.114B, que carrega um gene *fadD* proveniente de *E. coli* e gene *acr1* proveniente de *A. baylyi* ADP1. Os transformantes foram cultivados em 3 mL de um meio M9 contendo glicose 2%. Após indução com IPTG e adição de ácido octanóico 0,02%, a cultura foi permitida a crescer a 25°C por 40 horas. 3 mL de acetato de etila foi então adicionado a cultura inteira e misturado várias vezes utilizando um misturador. A fase de acetil acetato foi analisada através de GC/MS.

Surpreendentemente, nenhum acetato de acila foi observado no extrato de acetil acetato. Porém, octanoato de octila foi observado. Porém, a cepa controle sem o gene *SAAT* (C41(DE3, Δ*fadE*)/pRSET B+pAS004.114B) não produziu octanoato de octila. Além disso, a cepa (C41(DE3, Δ*fadE*)/pHZ1.43 B+pAS004.114B) na qual o gene da éster sintase proveniente de *A. baylyi* ADP1 foi carregado pelo pHZ1.43 produziu octanoato de octila (*veja* **FIGs 8A-D**).

A descoberta de que a atividade de *SAAT* produz octanoato de octila torna possível a produção de ésteres graxos de cadeia

média, tais como octanoato de octila e decanoato de octila, que apresenta baixos pontos de derretimento e são apropriados para uso como biocombustíveis e para substituição de biodiesel baseado em triglicerídeos.

EXEMPLO 8. PRODUÇÃO DE ÉSTERES GRAXOS NA CEPA DE *E. COLI* LS9001

Ésteres graxos foram produzidos através de engenheiramento de um hospedeiro de produção para expressar uma acil-CoA redutase, tioesterase formadora de álcool graxo, e uma éster sintase. Logo, o hospedeiro de produção produziu tanto o lado A quanto o lado B do éster e a estrutura de ambos os lados foi influenciada pela expressão do gene de tioesterase.

A cepa LS9001 foi transformada com plasmídeos carregando um gene de éster sintase proveniente de *A. baylyi* ADP1 (plasmídeo pHZ1.43), um gene de tioesterase proveniente de *Cuphea hookeriana* (plasmídeo pMAL-c2X-Tech), e um gene *fadD* proveniente de *E.coli* (plasmídeo pCDFDuet-1-fad).

Plasmídeo pHZ1.43 carregando a éster sintase (WSadp1, Nº de Acesso do GenBank AA017391, EC 2.3.175) foi construído como se segue. Primeiro o gene para Wsadp1 foi amplificado com os seguintes oligos utilizando sequência de DNA genômico proveniente de *A. baylyi* ADP1 como molde:

WSadp1_NdeI, 5'-TCATATGCGCCCATTACATCCG -3' (SEQ ID NO: 35); e

WSadp1_Avr, 5'- TCCTAGGAGGGCTAATTTAGCCCTTTAGTT-3' (SEQ ID NO:36).

Depois, o produto de PCR foi digerido com *Nde*I e *Avr*II e clonado em pCOLADuet-1 para gerar pHZ 1.43. O plasmídeo carregando *wSadp1* foi então co-transformado em *E. coli* cepa LS9001 com tanto pETDuet-1'TesA quanto pCDFDuet-1-*fadD-acr1*, e transformantes foram selecionados em placas de LB suplementados com 50 mg/L de canamicina, 50 mg/L de carbenicilina e 100 mg/L e espectinomicina.

Três transformantes foram inoculados em 3 mL de LBKCS (caldo LB suplementado com canamicina 50 mg/L, carbenicilina 50 mg/L, espectinomicina 100 mg/L, e glicose 10 g/L) e incubada a 37°C em um agitador (agitando a 250 rpm). Quando as culturas atingiram uma DO_{600} de por volta de 0,5, 1,5 mL de cada cultura foi transferido para frascos de 250 mL contendo 50 mL de LBKCS. Os frascos foram então incubados em um agitador (250 rpm) a 37°C até a cultura atingir uma DO_{600} de por volta de 0,5 a por volta de 1,0. IPTG foi então adicionado a uma concentração final de 1 mM. As culturas induzidas foram incubadas a 37°C em uma agitador (250 rpm) por mais 40-48 horas.

As culturas foram então transferidas em tubos cônicos de 50 mL e as células foram centrifugadas a 3.500 X *g* por aproximadamente 10 minutos. Cada um dos precipitados celulares foi então misturado com 5 mL de acetato de etila. Os extratos de acetato de etila foram analisados com GC/MS. A titulação de ésteres graxos (incluindo $C_{16}C_{16}$, $C_{14:1}C_{16}$, $C_{18:1}C_{18:1}$, C_2C_{14}, C_2C_{16}, $C_2C_{16:1}$, $C_{16}C_{16:1}$ e $C_2C_{18:1}$) foi de por volta de 10 mg/L. Quando uma cepa de *E. coli* carregando somente vetores vazios foi cultivada sob as mesmas condições e seguindo o mesmo protocolo, somente 0,2 mg/L de ésteres graxos foram encontrados no extrato de

acetato de etila.

EXEMPLO 9. PRODUÇÃO E LIBERAÇÃO DE ETIL ÉSTER GRAXO A PARTIR DE HOSPEDEIRO DE PRODUÇÃO

A cepa LS9001 foi transformada com plasmídeos carregando um gene de éster sintase proveniente de *A. baylyi* (plasmídeo pHZ1.43), um gene de tioesterase proveniente de *Cuphea hookeriana* (plasmídeo pMAL-c2X-TEcu) e um gene *fadD* proveniente de *E. coli* (plasmídeo pCDFDuet-1-*fadD*).

Essa cepa recombinante foi cultivada a 25°C em 3 mL de um meio M9 contendo canamicina 50mg/L, carbenicilina 100 mg/L, e espectinomicina 100 mg/L. Após indução com IPTG, o meio foi ajustado a uma concentração final de etanol 1% e glicose 2%.

A cultura foi permitida a crescer por 40 horas após indução com IPTG. As células foram separadas do meio gasto através de centrifugação a 3.500 X *g* por 10 minutos. O precipitado celular foi ressuspendido com 3 mL do meio M9. A suspensão celular e o meio gasto foram então extraídos com 1 volume de acetato de etila. As fases de acetato de etila da suspensão celular e sobrenadante foram submetidos à análise GC-MS.

O etil éster C_{16} foi a espécie de éster mais proeminente para essa tioesterase e 20% do éster graxo produzido foi liberado da célula. *Veja* **FIG. 8.** Uma *E. coli* controle cepa C41(DE3, Δ*fadE*) contendo pCOLADuet-1 (vetor vazio para o gene da éster sintase), pMAL-c2X-TEuc (contendo *fatB* proveniente de *U. california)* e pCDFDuet-1-fadD (gene *fadD* proveniente de *E. coli)* falharam em produzir quantidades detectáveis de etil ésteres de ácido graxo.

Os ésteres de ácido graxo foram quantificados utilizando etil éster de ácido palmítico comercial como referência.

Ésteres graxos foram também feitos utilizando os métodos descritos aqui exceto que metanol ou isopropanol foi adicionado ao caldo de fermentação. Os éteres graxos esperados foram produzidos.

EXEMPLO 10. A INFLUÊNCIA DE VÁRIAS TIOESTERASES NA COMPOSIÇÃO DE ETIL ÉSTERES GRAXOS PRODUZIDOS EM CEPAS RECOMBINANTES DE *E. COLI*.

As tioesterases FatB3 (*C. hookeriana*), 'TesA (*E. coli*), e FatB (*U. california*) foram expressas simultaneamente com éster sintase (proveniente de *A. baylyi*). Um plasmídeo, pHZ1.61, que contém um esqueleto de pCDFDuet-1 (Novagen, Madison, WI, EUA) com o gene *fadD*, foi construído através da substituição do fragmento *Not*I-*Avr*II (carregando o gene *acr1*) com o fragmento *Not*I-*Avr*II de pHZ1.43 de modo que *fadD* e a éster sintase *ADP1* estivessem em um plasmídeo e cada uma das sequências codificantes estivesse sob o controle de um promotor T7 em separado. A construção de pHZ1.61 tornou possível o uso de um sistema de dois plasmídeos ao invés de um sistema de três plasmídeos. pHZ1.61 foi então co-transformado em *E. coli* C41(DE3, Δ*fadE*) com um dos plasmídeos, cada um carregando um gene diferente de tioesterase como descrito aqui.

O total de etil ésteres de ácido graxo (tanto no sobrenadante quanto no fluído etil de ácido graxo intracelular) produzido por esses transformantes foram avaliados utilizando a técnica descrita aqui. As titulações e a composição dos etil

ésteres de ácido graxo estão resumidos na **Tabela 12.**

Tabela 12: Titulações (mg/L) e composição de etil ésteres de ácido graxo pela *E. coli* C41(DE3, Δ*fadE*)/pHZ1.61 recombinante e plasmídeos carregando vários genes tioesterase.

Tioesterases	C_2C_{10}	$C_2C_{12:1}$	C_2C_{12}	$C_2C_{14:1}$	C_2C_{14}	$C_2C_{16:1}$	C_2C_{16}	$C_2C_{18:1}$	Total
'TesA	0,0	0,0	6,5	0,0	17,5	6,9	21,6	18,1	70,5
ChFatB3	0,0	0,0	0,.0	0,0	10,8	12,5	11,7	13,8	48,8
ucFatB	6,4	8,5	25,3	14,7	0,0	4,5	3,7	6,7	69,8
pMAL	0,0	0,0	0,0	0,0	5,6	0,0	12,8	7,6	26,0

Nota: 'TesA, pETDuet-1-'TesA; chFatB3, pMAL-c2X-TEcu; ucFatB, pMAL-c2X-TEuc; pMAL, pMAL-c2X, o vetor vazio para genes de tioesterase utilizados no estudo.

EXEMPLO 11. UTILIZAÇÃO DE VÁRIAS ÉSTER SINTASES PARA PRODUZIR BIOCOMBUSTÍVEL

Quatro genes codificando éster sintases foram sintetizados baseados em sequências polinucleotídicas correspondentes reportadas no NCBI GenBank com pequenas modificações. Essas modificações incluem a remoção de sítios de restrição internos de *Nco*I, *Nde*I, *Hind*III, e *Avr*II sem introduzir outras modificações à sequência de aminoácido correspondente. Os quatro genes de interesse foram cada sintetizados com um sítio *Nde*I na extremidade 5' e um *Avr*II na extremidade 3'. As sequências foram então clonadas no sítio *Nde*I e *Avr*II de pCOLADuet-1 (Novagene) para produzir pHZ1.97-376, pHZ1.97-377, pHZ1.97-atfA1 e pHZ1.97-atfA2. Os plasmídeos carregando cada um dos quatro genes de interesse juntamente com os respectivos números de Acesso do GenBank e números de Acesso do GenPeptide estão listados na

Tabela 13 abaixo.

Tabela 13: Éster sintases

Plasmídeos	Identidade	Fontes originais de sequência de DNA	Nº de Acesso do GenBank	Nº de Acesso do GenPeptide
pHZ1.97-376	FES376(376)	*Marinobacter aquaeolei* VT8	CP000514.1	ABM17275
pHZ1.97-377	FES377(377)	*Marinobacter aquaeolei* VT8	CP000514.1	ABM20141
pHZ1.97-atfA1	FESA1(AtfA1)	*Alcanivorax borkumensis* SK2	NC_008260.1	YP_694462
pHZ1.97-atfA2	FESA2(AtfA2)	*Alcanivorax borkumensis* SK2	NC_008260.1	YP_693524

Cada um dos quatro plasmídeos foi transformado em *E. coli* C41 (DE3, Δ*fadE*Δ*fabR*)/ pETDuet-1-'TesA + pCDFDuet-1-*fadD*. Três transformantes de cada transformação foram selecionados para estudos de fermentação para determinar suas habilidades de sintetizar etil ésteres de ácido graxo. A etapa de fermentação foi desempenhada como descrito no EXEMPLO 6, porém em duas temperaturas diferentes, 25°C ou 37°C. Cepa C41 (DE3, Δ*fadE*Δ*fabR*)/ pETDuet-1-'TesA + pCDFDuet-1-*fadD*+pHZ1.43 (expressando ADP1 éster sintase) foi utilizada como um controle positivo e C41 (DE3, Δ*fadE*Δ*fabR*)/ pETDuet-1-'TesA + pCDFDuet-1-*fadD* como um controle negativo.

A expressão de cada um dos genes de éster sintase na cepa de *E. coli* com atividade atenuada de *fadE* e *fabR* e super-expressando '*tesA* e *fadD* permitiu a cada cepa produzir por volta de 250 mg/L de FAEE a 25°C. Essa foi a mesma quantidade produzida pelo controle positivo que expressou ADP1 éster sintase. Em contraste, a cepa de controle negativa produziu menos que 50 mg/L de FAEE sob as mesmas condições a 25°C (*veja,* **FIG. 9**). A composição de acil graxo de FAEE produzida a partir dessas quatro

éster sintases foi similar ao daquelas ADP1 éster sintases (*veja*, **FIG. 10**)

Resultados das fermentações desempenhadas a 37°C indicaram que cepas carregando pHZ1.97_aftA2 e cepas carregando pHZ1.97_376 produziu mais FAEE que o controle positivo carregando pHZ1.43 (*veja*, **FIG. 11**). As cepas carregando pHZ1.97_aftA2 e as cepas carregando pHZ1.97_376 também produziu grande quantidade de ácido graxo livre (*veja*, **FIG. 12**). Enquanto isso, a cepa carregando pHZ.143 não acumulou ácido graxo livre. Os resultados demonstraram que essas quatro éster sintases foram capazes de aceitar etanol e um amplo espectro de acil-CoA como substratos.

EXEMPLO 12. UTILIZAÇÃO DE ÉSTER SINTASE EUCARIÓTICA PARA PRODUZIR BIOCOMBUSTÍVEL

Esse exemplo descreve a clonagem e expressão de uma éster sintase proveniente de *Saccharomyces cerevisiae*. Plasmídeos foram gerados utilizando técnicas padrão de biologia molecular.

Tabela 14: Plasmídeos com *eeb1*

Nome Dado	Esqueleto do Vetor	Construção
pGL10.59	pCOLADuet-1 (Novagen)	Gene *eeb1** inserido entre sítios BamHI e HindIII (KanR)
pGL10.104	pMAL c2x (NEB)	Gene *eeb1** inserido entre sítios BamHI e HindIII (AmpR)
pMAL-c2X-Teuc	pMAL c2x (NEB)	*Veja* **Tabela 7** acima
pCDFDuet-1-acr1	pCDFDuet-1 (Novagen)	*Veja* **Tabela 7** acima

O gene *eeb1* de *Saccharomyces cerevisiae* (Número de Acesso do GenBank YPL095C) foi amplificado por PCR a partir de sequência de DNA genômico de *S. cerevisiae* utilizando oligos que introduziram os sítios 5' BamHI e 3' HindIII.

Uma *E. coli* C41 (DE3 Δ*fadE*) hospedeira de produção foi utilizada para expressar vários plasmídeos. As células de *E. coli* foram cultivadas em um meio mínimo M9 (contendo 6 g/L de Na_2HPO_4, 3 g/L de KH_2PO_4 , 0,5 g/L de NaCl, 1 g/L de NH_4Cl, 1 mg/L de tiamina (vit. B1), 1 mM de $MgSO_4$, 0,1 mM de $CaCl_2$, 0,4% (w/v) ou 2% (w/v) de glicose). Todas as soluções estoques de ácido graxo foram preparadas dissolvendo-se o sal de sódio ou potássio de ácido graxo em água destilada e deionizada em pH 7.0. Estoque de ácido octanóico foi comprado da Sigma, St. Louis, MO, EUA.

Fermentações foram desempenhadas utilizando a cepa C41 (DE3 Δ*fadE*) contendo plasmídeos pCDFDuet-1-acr1, pMAL-c2X-TEuc (*ucFatB*), e pGL10.59 (*eeb1*). A cepa controle foi a cepa C41 (DE3 Δ*fadE*) carregando pCDFDuet-1-*acr1*, pMAL-c2X-TEuc, e o vetor vazio pCOLADuet-1. Cada uma das três colônias de cada transformação foram utilizadas para inocular uma cultura inicial de M9 + 0,4% de glicose suplementada como carbenicilina (100 µg/mL), espectinomicina (100 µg/mL), e canamicina (50 µg/mL). As culturas foram permitidas a crescer a 37°C durante a noite. Culturas de produção foram estabelecidas através da diluição de 1:100 da cultura inicial para inocular 3 mL de meio M9 + 0,4% de glicose. As culturas de produção foram permitidas a crescer a 37°C até DO_{600} = 0,6 antes de serem induzidas com 1 mM de IPTG, alimentadas com 1% de etanol, e cultivadas por 40 horas adicionais a 25°C. Culturas de células inteiras foram extraídas

com igual volume de acetato de etila através de utilização de vórtex vigorosamente por 30 segundos. A fase orgânica foi retirada e examinada no GC/MS utilizando o método alkane_1_splitless_ctc.m para detecção de FAEE, que foi descrito acima no EXEMPLO 4, parte 2, "Quantificação de FA e FAEE na amostra #23-30".

Nenhum pico de FAEE foi detectado nas amostras. Com o intuito de determinar se *eeb1* foi expresso corretamente, culturas induzidas por IPTG e não induzidas foram analisadas através de SDS-PAGE. Nenhuma banda correspondendo ao tamanho de Eeb1 (por volta de 52 kDa) foi detectada. Isso sugere que, para esse sistema plasmidial particular, Eeb1 não foi bem expresso.

Experimentos de expressão adicionais foram desempenhados utilizando um vetor de expressão diferente. O gene foi clonado no vetor pMALc2x, que expressou a proteína alvo como uma fusão com proteína de ligação a maltose (MBP). Análise de SDS-PAGE de lisados de células inteiras revelaram que culturas induzidas com 1 mM de IPTG geraram uma banda de tamanho apropriado correspondendo à fusão Eeb1-MBP (por volta de 92 kDa). A banda não estava presente em células não induzidas. Esse experimento foi descrito em detalhes no International Application No. PCT/US08/058788, as revelações das quais estão incorporadas aqui por referência na íntegra.

A atividade enzimática de Eeb1 foi acessada utilizando a cepa C41 (DE3 Δ*fadE*) de *E. coli* carregando os plasmídeos pCDFDuet-1-*acr1* e pGL10.104 (*eeb1*). Uma C41 (DE3 Δ*fadE*) com pCDFDuet-1-*acr1* e pMALc2x serviu como a cepa controle. Três colônias foram escolhidas de cada transformação e cada uma foi

utilizada para inocular uma cultura inicial de M9 + 0,4% de glicose durante a noite suplementada com carbenicilina (100 µg/mL) e espectinomicina (100 µg/mL). Uma diluição de 1:100 da cultura inicial foi utilizada para inocular 10 mL de cultuas de produção com M9 + 0,4% de glicose. As culturas de produção foram permitidas a crescer a 37°C até DO_{600} = 0,4 – 0,5 antes de serem induzidas com 1mM de IPTG. As culturas foram cada uma alimentada com por volta de 1% de etanol, ácido octanóico (a por volta de 0,01% ou por volta de 0,02% do volume final), e/ou ácido decanóico (a por volta de 0,02% do volume final). Fermentações foram permitidas a continuar por 24 horas a 25°C. Extrações foram conduzidas através de adição de 1/10 do volume de 12 M de HCl e um volume igual de acetato de etila à cultura e utilização de vórtex por 30 segundos. Amostras foram analisadas através de GC/MS como descrito acima.

Dados de GC/MS revelaram que um pico correspondendo ao etil éster de ácido octanóico pode ser detectado para células expressando *eeb1* e alimentadas com ácido octanóico e etanol. A cepa do controle de vetor também apresentou um pico de C_2C_8, porém um pico menor que aquele obtido com as células expressando *eeb1*.

Células que foram alimentadas com 0,02% de ácido decanóico não cresceram bem; portanto, os estudos seguintes foram conduzidos utilizando 0,01% ou 0,005% de ácido decanóico. Para testar a habilidade de Eeb1 para utilizar alcoóis outros senão etanol na síntese de ésteres de ácido graxo, fermentações foram conduzidas utilizando a mesma cepa: C41 (DE3 Δ*fadE*) com pCDFDuet-1-acr1 e pGL10.104. Células foram cultivadas como previamente

descrito. Na indução, as células foram alimentadas com 0,02% de ácido octanóico com 1% de metanol, etanol, propanol, ou isopropanol. Células foram também alimentadas com 0,01% ou 0,005% de ácido decanóico e etanol 1%. Fermentações foram permitidas a continuar pós-indução por 24 hours a 25°C. Para preparar para análise através de GC/MS, culturas foram centrifugadas para separar o precipitado e o sobrenadante. O precipitado foi ressuspendido em um volume igual de um meio fresco M9 + 0,4% de glicose. Tanto a amostra do precipitado ressuspendido quanto do sobrenadante foram extraídas como descrito acima e analisadas através de GC/MS.

Todas as amostras de sobrenadante continham grandes quantidades de ácido graxo porém não houve detecção de ésteres de ácido graxo. Similarmente, as amostras de precipitado do controle de vetor não continha picos de éster de ácido graxo, como determinado utilizando-se GC/MS. Porém, células alimentadas com um ácido graxo C_{10} apresentou picos que foram identificados como representando ácido decanóico.

As amostras de precipitado derivadas de células expressando Eeb1 e alimentadas com um ácido graxo C_8 e propanol ou etanol apresentaram pequenos picos correspondendo a propil ou etil ésteres. Nenhum pico foi detectado a partir das células que foram alimentadas com metanol ou isopropanol. Culturas alimentadas com 0,01% ou 0,005% de um ácido graxo C_{10} e etanol também produziram um FAEE C_2C_{10}, porém o FAEE não foi encontrado nas amostras de precipitado.

Os resultados indicaram que Eeb1 foi capaz de sintetizar FAEEs utilizando ácidos octanóico ou decanóico, e também foi

capaz de utilizar metanol para gerar o metil éster octanóico. Porém, esses compostos foram altamente voláteis e desse modo os dados de GC/MS poderiam não ter refletido as verdadeiras titulações de maneira acurada. Para medir de maneira mais acurada a formação de produto uma cobertura de hexadecano foi utilizada para captura de FAEEs mais voláteis.

Atividade de Eeb1 no que diz respeito a substratos de ácido graxo foi acessada utilizando cepa C41 (DE3 Δ*fadE*) com pCDFDuet-1-acr1 e pGL10.104, que foi alimentada com ácidos graxos de cadeia com diferentes comprimentos. Células foram cultivadas como descrito acima, porém foram induzidas em DO_{600} = 0,8 - 0,9 de modo a promover melhor crescimento celular pós indução. Nesse ponto, células foram alimentadas com 1% de etanol e 0,02% de um ácido graxo C_8 ou 0,01% de uma combinação dos seguintes ácidos graxos: C_{10}, C_{12}, C_{14}, e C_{16}. Culturas que foram alimentadas com ácidos graxos C_8 ou C_{10} foram cobertas com 20% do volume total de hexadecano. Fermentações foram conduzidas por 24 horas adicionais a 25°C pós-indução. Para análise de produto, culturas inteiras (sem separação do sobrenadante e precipitado) foram extraídas como descrito aqui, com 1/10 do volume de HCl e um volume igual (ao volume da cultura) de acetato de etila. Amostras tratadas com hexadecano foram injetadas diretamente no GC/MS utilizando o programa hex_1_splitless_ctc.m, que está descrito acima no EXEMPLO 4, parte 2, "Quantificação de FA e FAEE na amostra #23-30".

Nenhum dos controles de vetor apresentou qualquer pico detectável de FAEE. Para células alimentadas com C_8 e C_{10}, picos grandes de C_2C_8 e C_2C_{10} foram detectados nas amostras dos

hexadecanos, porém não nas amostras de acetato de etila. Isso demonstra que hexadecano foi capaz de imobilizar os FAEEs voláteis. Para o resto das amostras de acetato de etila, pequenos picos foram detectados para FAEEs C_2C_{12} e C_2C_{14}, porém nenhum FAEE C_2C_{16} foi detectado. Logo, Eeb1 gerou etil ésteres utilizando ácidos graxos com comprimentos de cadeia de C_8 a C_{14}. Eeb1 favoreceu C_8 e C_{10} em detrimento de ácidos graxos de cadeia maiores.

EXEMPLO 13. INTEGRAÇÃO GENÔMICA DE SEQUÊNCIAS RECOMBINANTES PARA FAZER UM HOSPEDEIRO DE PRODUÇÃO QUE SUPER-EXPRESSA OS GENES DE *E. COLI FABA* E/OU *FABB*.

É conhecido que o produto do gene *fabR* age como repressor da expressão dos genes *fabA* e *fabB*. É também conhecido que FadR trabalha como um ativador dos mesmos genes. As sequências de ligação de FabR e do consenso predito foram previamente publicadas por *Zhang et al.*, J. Biol. Chem. 277: 15558-15565, 2002. As sequências de ligação consenso e suas localizações relativas aos genes *fabA* e *fabB* de *E. coli* são mostradas na **FIG. 13.**

Uma cepa mutante nulo de *fabR* de *E. coli* foi criada. Oligos TrmA_R_NotI e FabR_FOP foram utilizados para amplificar por volta de 1.000 pb a montante de *fabR*, e oligos SthA_F_Bam e FabR_ROP foram utilizados para amplificar por volta de 1000 pb a jusante de *fabR*. PCR de sobreposição foi aplicado para criar uma construção da deleção em fase do gene *fabR* completo. A construção de deleção de *fabR* foi clonada no plasmídeo sensível a temperatura pKOV3, que continha SacB para contra-seleção. Uma deleção cromossomal de *fabR* foi feita de acordo com o método

descrito em *Link et al.*, J. Bact., 179:6228-6237, 1997.

Tabela 15: Oligos do nulo *fabR*

Nome do Oligo	Sequência do Oligo (5'-3')
TrmA_R_Not	ATAGTTTAGCGGCCGCAAATCGAGCTGGATCAGGATTA (SEQ ID NO:37)
FabR_FOP	AGGATTCAGACATCGTGATGTAATGAAACAAGCAAATCAAGATAGA (SEQ ID NO:38)
SthA F Bam	CGCGGATCCGAATCACTACGCCACTGTTCC (SEQ ID NO:39)
FabR_ROP	TTGATTTGCTTGTTTCATTACATCACGATGTCTGAATCCTTG (SEQ ID NO:40)

EXEMPLO 14. CONSTRUÇÃO DE HOSPEDEIRO DE PRODUÇÃO

Tabela 16 identifica os homólogos de certos genes descritos aqui, que são conhecidos a serem expressos em microorganismos que produzem biodieseis, alcoóis graxos, e hidrocarbonos. Para aumentar a produção de ácido graxo e, portanto, produção de hidrocarbono nos hospedeiros de produção tais como aqueles identificados na **Tabela 16**, genes heterólogos podem ser expressos, tais como aqueles provenientes de *E. coli*.

Alguém de habilidade básica na arte irá apreciar que genes que são endógenos aos microorganismos providos na **Tabela 16** podem também ser expressos, super-expressos, ou atenuados utilizando os métodos descritos aqui. Além disso, genes que são descritos na **Tabela 16** podem ser expressos, super-expressos, ou atenuados nos hospedeiros de produção que produzem endogenamente hidrocarbonos que permitem a produção de hidrocarbonos específicos com comprimento de cadeia de carbono definida, pontos de saturação, e pontos de ramificação.

Tabela 16: Hospedeiros de produção de hidrocarbonos

Organismo	Nome do Gene	Nº de Acesso/SEQ ID/Loci	EC No.
Desulfovibrio desulfuricans G20	*accA*	YP 388034	6.4.1.2
Desulfovibrio desulfuricans G22	*accC*	YP 388573/YP 388033	6.3.4.14, 6.4.1.2
Desulfovibrio desulfuricans G23	*accD*	YP 388034	6.4.1.2
Desulfovibrio desulfuricans G28	*fabH*	YP 388920	2.3.1.180
Desulfovibrio desulfuricans G29	*fabD*	YP 388786	2.3.1.39
Desulfovibrio desulfuricans G30	*fabG*	YP 388921	1.1.1.100
Desulfovibrio desulfuricans G31	*acpP*	YP 388922/YP 389150	3.1.26.3, 1.6.5.3, 1.6.99.3
Desulfovibrio desulfuricans G32	*fabF*	YP 388923	2.3.1.179
Desulfovibrio desulfuricans G33	*gpsA*	YP 389667	1.1.1.94
Desulfovibrio desulfuricans G34	*ldhA*	YP 388173/YP 390177	1.1.1.27, 1.1.1.28
Erwinia (micrococcus) amylovora	*accA*	942060 - 943016	6.4.1.2
Erwinia (micrococcus) amylovora	*accB*	3440869 - 3441336	6.4.1.2
Erwinia (micrococcus) amylovora	*accC*	3441351 - 3442697	6.3.4.14, 6.4.1.2
Erwinia (micrococcus) amylovora	*accD*	2517571 - 2516696	6.4.1.2
Erwinia (micrococcus) amylovora	*fadE*	1003232 - 1000791	1.3.99.-
Erwinia (micrococcus) amylovora	*plsB(D311E)*	333843 - 331423	2.3.1.15
Erwinia (micrococcus) amylovora	*aceE*	840558 - 843218	1.2.4.1
Erwinia (micrococcus) amylovora	*aceF*	843248 - 844828	2.3.1.12
Erwinia (micrococcus) amylovora	*fabH*	1579839 - 1580789	2.3.1.180
Erwinia (micrococcus) amylovora	*fabD*	1580826 - 1581749	2.3.1.39

Organismo	Nome do Gene	Nº de Acesso/SEQ ID/Loci	EC No.
Erwinia (micrococcus) amylovora	*fabG*	CAA74944	1.1.1.100
Erwinia (micrococcus) amylovora	*acpP*	1582658 - 1582891	3.1.26.3, 1.6.5.3, 1.6.99.3
Erwinia (micrococcus) amylovora	*fabF*	1582983 - 1584221	2.3.1.179
Erwinia (micrococcus) amylovora	*gpsA*	124800 - 125810	1.1.1.94
Erwinia (micrococcus) amylovora	*ldhA*	1956806 - 1957789	1.1.1.27, 1.1.1.28
Kineococcus radiotolerans SRS30216	*accA*	ZP 00618306	6.4.1.2
Kineococcus radiotolerans SRS30216	*accB*	ZP 00618387	6.4.1.2
Kineococcus radiotolerans SRS30216	*accC*	ZP_00618040 /ZP 00618387	6.3.4.14, 6.4.1.2
Kineococcus radiotolerans SRS30216	*accD*	ZP 00618306	6.4.1.2
Kineococcus radiotolerans SRS30216	*fadE*	ZP 00617773	1.3.99.-
Kineococcus radiotolerans SRS30216	*plsB(D311E)*	ZP 00617279	2.3.1.15
Kineococcus radiotolerans SRS30216	*aceE*	ZP 00617600	1.2.4.1
Kineococcus radiotolerans SRS30216	*aceF*	ZP 00619307	2.3.1.12
Kineococcus radiotolerans SRS30216	*fabH*	ZP 00618003	2.3.1.180

Organismo	Nome do Gene	Nº de Acesso/SEQ ID/Loci	EC No.
Kineococcus radiotolerans SRS30216	*fabD*	ZP 00617602	2.3.1.39
Kineococcus radiotolerans SRS30216	*fabG*	ZP 00615651	1.1.1.100
Kineococcus radiotolerans SRS30216	*acpP*	ZP 00617604	3.1.26.3, 1.6.5.3, 1.6.99.3
Kineococcus radiotolerans SRS30216	*fabF*	ZP 00617605	2.3.1.179
Kineococcus radiotolerans SRS30216	*gpsA*	ZP 00618825	1.1.1.94
Kineococcus radiotolerans SRS30216	*ldhA*	ZP 00618879	1.1.1.28
Rhodospirillum rubrum	*accA*	YP 425310	6.4.1.2
Rhodospirillum rubrum	*accB*	YP 427521	6.4.1.2
Rhodospirillum rubrum	*accC*	YP_427522/YP_425144/YP_427028/YP_426209/ YP 427404	6.3.4.14, 6.4.1.2
Rhodospirillum rubrum	*accD*	YP 428511	6.4.1.2
Rhodospirillum rubrum	*fadE*	YP 427035	1.3.99.-
Rhodospirillum rubrum	*aceE*	YP 427492	1.2.4.1
Rhodospirillum rubrum	*aceF*	YP 426966	2.3.1.12
Rhodospirillum rubrum	*fabH*	YP 426754	2.3.1.180
Rhodospirillum rubrum	*fabD*	YP 425507	2.3.1.39
Rhodospirillum rubrum	*fabG*	YP 425508/YP 425365	1.1.1.100
Rhodospirillum rubrum	*acpP*	YP 425509	3.1.26.3, 1.6.5.3, 1.6.99.3

Organismo	Nome do Gene	Nº de Acesso/SEQ ID/Loci	EC No.
Rhodospirillum rubrum	*fabF*	YP_425510/YP_425510 /YP 425285	2.3.1.179
Rhodospirillum rubrum	*gpsA*	YP 428652	1.1.1.94
			1.1.1.27
Rhodospirillum rubrum	*ldhA*	YP 426902/YP 428871	1.1.1.28
Vibrio furnissii	*accA*	1, 16	6.4.1.2
Vibrio furnissii	*accB*	2, 17	6.4.1.2
Vibrio furnissii	*accC*	3, 18	6.3.4.14, 6.4.1.2
Vibrio furnissii	*accD*	4, 19	6.4.1.2
Vibrio furnissii	*fadE*	5, 20	1.3.99.-
Vibrio furnissii	*plsB(D311E)*	6, 21	2.3.1.15
Vibrio furnissii	*aceE*	7, 22	1.2.4.1
Vibrio furnissii	*aceF*	8, 23	2.3.1.12
Vibrio furnissii	*fabH*	9, 24	2.3.1.180
Vibrio furnissii	*fabD*	10, 25	2.3.1.39
Vibrio furnissii	*fabG*	11, 26	1.1.1.100
Vibrio furnissii	*acpP*	12, 27	3.1.26.3, 1.6.5.3, 1.6.99.3
Vibrio furnissii	*fabF*	13, 28	2.3.1.179
Vibrio furnissii	*gpsA*	14, 29	1.1.1.94
Vibrio furnissii	*ldhA*	15, 30	1.1.1.27, 1.1.1.28
Stenotrophomonas maltophilia R551-3	*accA*	ZP 01643799	6.4.1.2
Stenotrophomonas maltophilia R551-3	*accB*	ZP 01644036	6.4.1.2
Stenotrophomonas maltophilia R551-3	*accC*	ZP 01644037	6.3.4.14, 6.4.1.2
Stenotrophomonas maltophilia R551-3	*accD*	ZP 01644801	6.4.1.2
Stenotrophomonas maltophilia R551-3	*fadE*	ZP 01645823	1.3.99.-

Organismo	Nome do Gene	Nº de Acesso/SEQ ID/Loci	EC No.
Stenotrophomonas maltophilia R551-3	*plsB(D311E)*	ZP 01644152	2.3.1.15
Stenotrophomonas maltophilia R551-3	*aceE*	ZP 01644724	1.2.4.1
Stenotrophomonas maltophilia R551-3	*aceF*	ZP 01645795	2.3.1.12
Stenotrophomonas maltophilia R551-3	*fabH*	ZP 01643247	2.3.1.180
Stenotrophomonas maltophilia R551-3	*fabD*	ZP 01643535	2.3.1.39
Stenotrophomonas maltophilia R551-3	*fabG*	ZP 01643062	1.1.1.100
Stenotrophomonas maltophilia R551-3	*acpP*	ZP 01643063	3.1.26.3 1.6.5.3, 1.6.99.3
Stenotrophomonas maltophilia R551-3	*fabF*	ZP 01643064	2.3.1.179
Stenotrophomonas maltophilia R551-3	*gpsA*	ZP 01643216	1.1.1.94
Stenotrophomonas maltophilia R551-3	*ldhA*	ZP 01645395	1.1.1.28
Synechocystis sp. PCC6803	*accA*	NP 442942	6.4.1.2
Synechocystis sp. PCC6803	*accB*	NP 442182	6.4.1.2
Synechocystis sp. PCC6803	*accC*	NP 442228	6.3.4.14, 6.4.1.2
Synechocystis sp. PCC6803	*accD*	NP 442022	6.4.1.2
Synechocystis sp. PCC6803	*fabD*	NP 440589	2.3.1.39

Organismo	Nome do Gene	Nº de Acesso/SEQ ID/Loci	EC No.
Synechocystis sp. PCC6803	*fabH*	NP 441338	2.3.1.180
Synechocystis sp. PCC6803	*fabF*	NP 440631	2.3.1.179
Synechocystis sp. PCC6803	*fabG*	NP 440934	1.1.1.100, 3.1.26.3
Synechocystis sp. PCC6803	*fabZ*	NP 441227	4.2.1.60
Synechocystis sp. PCC6803	*fabI*	NP 440356	1.3.1.9
Synechocystis sp. PCC6803	*acp*	NP 440632	
Synechocystis sp. PCC6803	*fadD*	NP 440344	6.2.1.3
Synechococcus elongates PCC7942	*accA*	YP 400612	6.4.1.2
Synechococcus elongates PCC7942	*accB*	YP 401581	6.4.1.2
Synechococcus elongates PCC7942	*accC*	YP 400396	6.3.4.14, 6.4.1.2
Synechococcus elongates PCC7942	*accD*	YP 400973	6.4.1.2
Synechococcus elongates PCC7942	*fabD*	YP 400473	2.3.1.39
Synechococcus elongates PCC7942	*fabH*	YP 400472	2.3.1.180
Synechococcus elongates PCC7942	*fabF*	YP 399556	2.3.1.179
Synechococcus elongates PCC7942	*fabG*	YP 399703	1.1.1.100, 3.1.26.3
Synechococcus elongates PCC7942	*fabZ*	YP 399947	4.2.1.60

Organismo	Nome do Gene	Nº de Acesso/SEQ ID/Loci	EC No.
Synechococcus elongates PCC7942	*fabI*	YP 399145	1.3.1.9
Synechococcus elongates PCC7942	*acp*	YP 399555	
Synechococcus elongates PCC7942	*fadD*	YP 399935	6.2.1.3

Os Números de Acesso da Tabela 16 são do GenBank, Versão 159.0 de 15 de abril de 2007, Números EC da Tabela 16 são do KEGG, Versão 42.0 de abril de 2007 (mais atualizações diárias até e incluindo 9 de maio de 2007), resultados para cepa Ea273 de *Erwinia amylovora* foram obtidas a partir do centro de sequenciamento de Sanger, sequência "shotgun" completada como a de 9 de maio de2007, posições para *Erwinia* representam localizações no pseudo-cromossomo de Sanger, sequências provenientes de *Vibrio furnisii* M1 são do pseudo-cromossomo VFM1, montagem v2, como a de 28 de setembro de 2006, e incluem o gene inteiro, e podem também incluir sequências flanqueadoras.

EXEMPLO 15. CEPAS DE PRODUÇÃO EXEMPLARES ADICIONAIS

Tabela 17 provê cepas de produção exemplares adicionais. Duas vias biossintéticas exemplares são descritas para a produção de ácidos graxos, alcoóis graxos, e ésteres de cera. Por exemplo, **Tabela 17** provê exemplos 1 e 2 que produzem ácidos graxos. A cepa hospedeira de produção utilizada para produzir ácidos graxos no exemplo 1 é uma célula hospedeira de produção que é engenheirada para apresentar as atividades enzimáticas sintéticas desejadas. Cada "x" marca os genes correlacionado com

as atividades, por exemplo, atividade de acetil-CoA carboxilase, tioesterase, e acil-CoA sintase. Células hospedeiras de produção podem ser selecionadas a partir de bactérias, leveduras, e fungos. Como provido na **Tabela 17**, hospedeiros de produção adicionais podem ser criados utilizando os genes exógenos indicados.

Tabela 17: Combinação de genes úteis para gerar cepas de produção geneticamente engenheiradas

Peptídeo	**Fontes dos genes**	**Genes**	**Ácidos graxos**		**Alcoóis graxos**		**Cera /ésteres graxos**	
			exemplo 1	exemplo 2	exemplo 1	exemplo 2	exemplo 1	exemplo 2
acetil-CoA carboxilase	*E. coli*	accABCD	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**
tio-esterase	*E. coli*	'TesA	**X**		**X**		**X**	**X**
	Cinnamomum camphora	ccFatB						
	Umbellularia californica	umFatB		**X**		**X**		
	Cuphea hookeriana	chFatB2						
	Cuphea hookeriana	chFatB3						
	Cuphea hookerian	chFatA						
	Arabidopsis thaliana	AtFatA1						
	Arabidopsis thaliana	AtFatB1[M141T]						
acil-CoA sintase	*E. coli*	fadD	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**
acil-CoA redutase	*Bombyx mori*	bFAR						

Peptídeo	**Fontes dos genes**	**Genes**	**Ácidos graxos**		**Alcoóis graxos**		**Cera /ésteres graxos**	
			exemplo 1	exemplo 2	exemplo 1	exemplo 2	exemplo 1	exemplo 2
	Acinetobacter baylyi ADP1	acr1			**X**		**X**	
	Simmondsia chinesis	jjFAR				**X**		**X**
	Triticum aestivum	TTA1						
	Mus musculus	mFAR1						
	Mus musculus	mFAR2						
	Acinetpbacter sp M1	acrM1						
	Homo sapiens	hFAR						
Éster sintase/ álcool acil-transferase	*Fundibacter jadensis* DSM 12178	WST9						
	Acinetobacter sp. HO1-N	WSHN					**X**	
	Acinetobacter baylyl ADP1	WSadp1						**X**
	Mus musculus	mWS						
	Homo sapiens	hWS						
	Fragaria x ananassa	SAAT						
	Malus x domestica	MpAAT						
	Simmondsia chinensis	JjWS (AAD38041)						
Decarbonilase	*Arabidopsis thaliana*	cer1						
	Oryza sativa	cer1						
Proteína de transpor	*Acinetobacter sp. HO1-N*	desconhecido					**X**	**X**

Peptídeo	**Fontes dos genes**	**Genes**	**Ácidos graxos**		**Alcoóis graxos**		**Cera /ésteres graxos**	
			exemplo 1	exemplo 2	exemplo 1	exemplo 2	exemplo 1	exemplo 2
te	*Arabidopsis thaliana*	Cer5						

EXEMPLO 16. UTILIZAÇÃO DE ACIL-COA SINTASES ADICIONAIS PARA SUPER-PRODUZIR ACIL-COA

Homólogos de *fadD* de *E. coli* podem ser expressos em *E. coli* através de síntese de genes com códon otimizado baseado em uma sequência desejada proveniente de *M. tuberculosis* HR7Rv (NP_217021, FadDD35), *B. subtilis* (NP_388908, YhfL), *Saccharomyces cerevisiae* (NP_012257, Faa3p) ou *P. aeruginosa* PAO1 (NP_251989). Os genes sintéticos podem ser desenhados para incluir as protrusões compatíveis de *Nco*I e *Hind*III. As acil-CoA sintases podem então ser clonados em um vetor pTrcHis2 digerido com *Nco*I/*Hind*III (Invitrogen Corp., Carlsbad, California) como descrito acima e expresso em *E. coli* cepa MG1655 Δ*fadE*. A expressão em *E. coli* pode levar a uma produção aumentada de acil-CoA.

Derivados de ácido graxo tais como um FAEE pode também ser produzido através de co-transformação da *E. coli* cepa MG1655 Δ*fadE* com várias acil-CoA sintases no vetor pTrcHis2 com um plasmídeo compatível derivado de pCL1920, que contém o gene de tioéster proveniente de *Cuphea hookeriana* com ou sem uma éster sintase proveniente de *A. baylyi*. O hospedeiro de produção resultante irá produzir FAEE quando cultivado em um meio contendo etanol como descrito acima.

EXEMPLO 17. UTILIZAÇÃO DE ACIL-COA SINTASES ADICIONAIS PARA SUPER-PRODUZIR ACIL-COA

Sequências de DNA ou sequências de proteína de muitos homólogos de FadD de *E. coli* são conhecidos. Porém, as propriedades bioquímicas de somente poucas foram descritas. *Veja*, *ex.*, *Knoll et al.*, J. Biol. Chem. 269(23):16348-56, 1994; *Shockey et al.*, Plant Physiol. 132: 1065-1076, 2003. Além disso, suas capacidades de serem expressas em uma forma ativa em níveis suficientemente altos para propósitos comerciais é desconhecido. Para explorar a possibilidade de utilizar acil-CoA sintases heterólogas para produção de ésteres, vários genes de acil-CoA sintase foram clonados e expressos como se segue. Apesar de esse exemplo descrever a transformação do hospedeiro de produção com plasmídeos separados para a tioesterase, éster sintase, e genes acil-CoA sintase, esse genes podem alternativamente ser incorporados em um único plasmídeo para transformar o hospedeiro de produção.

Construção do plasmídeo pOP-80

Para super-expressar os genes, um plasmídeo baixa cópia baseado no vetor comercial pCL1920 (*Lerner* e *Inouye*, NAR 18: 4631, 1990) carregando um promotor transcricional forte foi construído através de digestão de pCL1920 com enzimas de restrição AflII e SfoI (New England BioLabs Inc. Ipswich, MA, EUA). Os três fragmentos de sequência de DNA foram produzidos através dessa digestão. O fragmento de 3737 pb foi purificado do gel utilizando um "kit" de purificação de gel (Qiagen, Inc. Valencia, CA, EUA). Em paralelo, um fragmento contendo o promotor *trc* e a região *lacI* do plasmídeo comercial pTrcHis2 (Invitrogen,

Carlsbad, CA, EUA) foi amplificado através de PCR utilizando os oligos LF302: 5'-ATATGACGTCGGCATCCGCTTACAGACA-3'(SEQ ID NO:41); e LF303: 5'-AATTCTTAAGTCAGGAGAGCGTTCACCGACAA-3'(SEQ ID NO:42). Esse dois oligos também introduziram sítios de reconhecimento para as enzimas de restrição ZraI (gacgtc) e AflII(cttaag), respectivamente, na extremidade dos produtos de PCR. Após amplificação, os produtos de PCR foram purificados utilizando um "kit" de purificação de PCR (Qiagen, Inc. Valencia, CA, EUA) e digeridos com ZraI e AflII seguindo as condições recomendadas pelo fabricante (New England BioLabs Inc., Ipswich, MA, EUA). Após digestão, o produto de PCR foi purificado do gel e ligado com o fragmento de sequência de DNA de 3737 pb derivado de pCL1920.

Após transformação com a mistura de ligação em células quimio-competentes TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), transformantes foram selecionados em placas de Agar Luria contendo 100 µg/mL de espectinomicina. Muitas colônias foram visíveis após incubação durante a noite a 37°C. Plasmídeos presente nessas colônias foram purificados, analisados com enzimas de restrição, e então sequenciados. Um plasmídeo produzido dessa forma foi retido, chamado pOP-80, e utilizado para experimentos adicionais. Um mapa de pOP-80 é mostrado na Figura 15.

As sequências de DNA de regiões relevantes do plasmídeo pOP-80 foram verificadas. Foi encontrado nas junções onde os dois fragmentos foram ligados que 3 a 4 bases de cada extremidade estavam ausentes. Isso foi provavelmente causado por uma atividade exonucleásica contaminando uma das enzimas de

restrição. É provável que essas pequenas deleções não afetaram qualquer função relevante do plasmídeo. O plasmídeo resultante foi utilizado para todos os experimentos de expressão descrito nesse exemplo. A sequência completa do plasmídeo é revelada como SEQ ID NO:1 na **FIG.17.**

Clonagem de *fadD35* proveniente de *Mycobacterium tuberculosis* HR7Rv

Um gene de *E. coli* com códon otimizado foi sintetizado pela DNA 2.0 Inc. (Menlo Park, CA, EUA), utilizando a sequência protéica do gene *fadD35* depositado no NCBI com Nº de Acesso do GenBank NP_217021 como um ponto de início. O gene sintético continha um único sítio NcoI na extremidade 5' e um único sítio EcoRI na extremidade 3'. O gene sintético foi provido pela DNA 2.0 Inc. e clonado em plasmídeo pJ201:16084. O gene *fad35* foi liberado a partir desse plasmídeo através de digestão com NcoI e EcoRI. A sequência desse fragmento é mostrado em SEQ ID NO:2 na **FIG. 18.** O fragmento de sequência de DNA resultante revelado em SEQ ID NO:2 foi ligado com pOP-80, que foi previamente digerido com NcoI e EcoRI. A mistura de ligação foi transformada em células quimio-competentes TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), que foram então plaqueadas em placas de ágar Luria contendo 100 µg/mL de espectinomicina e incubada a 37°C durante a noite. Colônias que apareceram no dia seguinte foram varridas, e uma cepa contendo o plasmídeo correto foi identificada. O plasmídeo foi chamado pDS9.

Clonagem de *fadD1* proveniente de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

Um gene de *E. coli* com códon otimizado foi sintetizado pela DNA 2.0 Inc. (Menlo Park, CA, EUA), utilizando a sequência protéica do gene *fadD1* depositado no NCBI com Nº de Acesso do GenBank NP_251989 como um ponto de início. O gene sintético continha um único sítio BspHI na extremidade 5′ e um único sítio EcoRI na extremidade 3′. O gene sintético foi provido pela DNA 2.0 Inc. e clonado em plasmídeo pJ201:16083. O gene *fad1* foi liberado a partir desse plasmídeo através de digestão com BspHI e EcoRI. A sequência desse fragmento é mostrada em SEQ ID NO:3. O fragmento de sequência de DNA resultante revelado em SEQ ID NO:3 foi ligado com pOP-80, que foi previamente digerido com NcoI e EcoRI. A mistura de ligação foi transformada em células quimio-competentes TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), que foram então plaqueadas em placas de ágar Luria contendo 100 µg/mL de espectinomicina e incubada a 37°C durante a noite. Colônias que apareceram no dia seguinte foram varridas, e uma cepa contendo o plasmídeo correto foi identificada. O plasmídeo foi chamado pDS8.

Clonagem de *yhfL* proveniente de *Bacillus subtilis*

O gene *yhfL* foi amplificado através de PCR utilizando sequência de DNA cromossomal de *Bacillus subtilis* I168 como um molde, e dois oligos desenhados baseados na sequência de DNA depositado no NCBI com Nº de Acesso do GenBank NC_000964. As sequências dos 2 oligos foram:

BsyhfLBspHIF: 5′-CATCATGAATCTTGTTTC-3′ (SEQ ID NO:4)

BsyhfLEcoR: 5′- CGGAATTCTTATTGGGGCAAAATATC-3′ (SEQ ID NO:5)

Esses dois oligos introduziram um sítio de reconhecimento de BspHI na extremidade 5′ e um sítio de reconhecimento de EcoRI na extremidade 3′. O produto de PCR foi clonado diretamente em um vetor pCR-Blunt II-TOPO utilizando "kit" de clonagem Zero Blunt TOPO PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Um plasmídeo carregando o gene *yhfL* foi chamado pDS1. Para sub-clonar *yhfL*, plasmídeo pDS1 foi digerido com BspHI e EcoRI. O fragmento de sequência de DNA resultante SEQ ID NO:6 foi purificado do gel e clonado em pOP-80, que foi previamente digerido com NcoI e EcoRI. O plasmídeo carregando o gene *yhfL* de *B. subtilis* em pOP-80 foi chamado pDS4.

Clonagem de *faa3p* proveniente de *Saccharomyces cerevisiae* (NP_012257)

O gene *faa3p* foi amplificado através de PCR utilizando sequência de DNA cromossomal ATCC 204508D (American Type Culture Collection, Manassas, VA, EUA) de *Saccharomyces cerevisiae* como um molde, e dois oligos que foram desenhados baseado na sequência de DNA depositada no NCBI com Nº de Acesso do GenBank NC_001141 como um molde. As sequências dos dois oligos foram:

Scfaa3pPciF: 5′-CGACATGTCCGAACAACAC-3′ (SEQ ID NO:7)

Scfaa3pPciI: 5′-GCAAGCTTCTAAGAATTTTCTTTG-3′ (SEQ ID NO:8)

Esses dois oligos introduziram um sítio de reconhecimento de PciI na extremidade 5′ e um sítio de reconhecimento de HindIII na extremidade 3′.

O produto de PCR foi clonado diretamente em um vetor pCR-Blunt II-TOPO utilizando "kit" de clonagem Zero Blunt TOPO PCR

(Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Um plasmídeo carregando o gene *faa3p* foi chamado pDS2. Para sub-clonar *faa3p*, plasmídeo pDS2 foi digerido com PciI e HindIII. O fragmento de sequência de DNA resultante (SEQ ID NO:9) foi purificado do gel e clonado em pOP-80, que foi previamente digerido com NcoI e HindIII. O plasmídeo carregando o gene *faa3p* de *S. cerevisiae* em pOP-80 foi chamado pDS5.

Clonagem de ZP 01644857 proveniente de *Stenotrophomonas maltophilia* R551-3

A sequência do gene estrutural para a proteína ZP_01644857 está disponível no NCBI como parte do lócus NZ_AAVZ01000044. O gene foi amplificado através de PCR utilizando sequência de DNA cromossomal de *Stenotrophomonas maltophilia* R551-3 como molde, e dois oligos desenhados baseados na sequência de DNA depositada. As sequências dos dois oligos foram:

Smprk59BspF: 5'- AGTCATGAGTCTGGATCG-3' (SEQ ID NO:10)

Smprk59HindR: 5'- GGAAGCTTACGGGGCGGGCG-3' (SEQ ID NO:11)

Esses dois oligos introduziram um sítio de reconhecimento de BspHI na extremidade 5' e um sítio de reconhecimento de HindIII na extremidade 3'.

O produto de PCR foi clonado diretamente em um vetor pCR-Blunt II-TOPO utilizando "kit" de clonagem Zero Blunt TOPO PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Um plasmídeo carregando o gene codificando a proteína ZP_01644857 foi chamado pDS3. Para facilitar sub-clonagem adicional do gene, um sítio BspHI interno foi removido através de mutagênese sítio dirigida utilizando o

oligo PrkBsp:5'-GCGAACGGCCTGGTCTTTATGAAGTTCGGTGG-3'(SEQ ID NO:12) e o "kit" de mutagênese QuikChange Multi Site-Directed (Stratagene, La Jolla, CA, EUA). Após mutação apropriada foi corroborada através de sequenciamento de DNA, o plasmídeo resultante foi digerido com PciI e HindIII. O fragmento de sequência de DNA resultante (SEQ ID NO:9) foi purificado do gel e clonado em pOP-80, que foi previamente digerido com BspHI e HindIII, e foi chamado pDS6. O fragmento de sequência de DNA resultante foi purificado do gel e clonado em pOP-80, que foi previamente digerido com NcoI e HindIII. O plasmídeo carregando o gene codificando a proteína ZP_01644857 clonado em pOP-80 foi chamado pDS7. A sequência protéica de ZP_01644857 é revelada na (SEQ ID NO:13).

Construção de cepas para produzir ésteres graxos.

Uma cepa de *E. coli* BL21(DE3) foi primeiro transformada com plasmídeo pETDuet-1-'TesA (descrito no EXEMPLO 2) carregando o gene *'tesA* de *E. coli*, e plasmídeo pHZ1.97 (descrito no EXEMPLO 9) carregando o gene da éster sintetase *atfA2*, respectivamente. Ambos os genes estavam sob o controle de um promotor T7 induzível por IPTG. Dois transformante independentes carregando ambos os plasmídeos foram transformados com cada um dos plasmídeos recombinantes carregando os genes *fadD* heterólogos, e selecionado em placas de ágar Luria contendo 100 µg/mL de carbenicilina, 50 µg/mL de canamicina, e 100 µg/mL de espectinomicina. Três colônias independentes carregando os três plasmídeos foram avaliadas para produção de éster graxo.

Análise de ésteres graxos produzidos utilizando ZP 01644857 proveniente de *Stenotrophomonas maltophilia* R551-3

Para avaliar a utilização da proteína ZP_01644857 proveniente de *Stenotrophomonas maltophilia* R551-3 em um hospedeiro de produção para produzir ésteres graxos, uma cepa de *E. coli* BL21(DE3) foi transformada com plasmídeo pETDuet-1-'TesA (descrito no EXEMPLO 2) carregando o gene *'tesA* de *E. coli*, plasmídeo pHZ1.97 (descrito no EXEMPLO 9) carregando o gene codificando a proteína ZP_01644857 (descrito acima no presente exemplo). Esse hospedeiro de produção foi fermentado para produzir ésteres graxos descritos no EXEMPLO 4. Como um controle, uma segunda *E. coli* cepa BL21(DE3)ΔfadE contendo plasmídeos pETDuet-1-'TesA, pHZ1.97, e pCL1920 foi utilizado como um hospedeiro de produção para produzir ésteres graxos.

Tabela 18 abaixo indica as produtividades de éster graxo a partir desses hospedeiros de produção.

Tabela 18. Produtividades de éster graxo a partir de um hospedeiro de produção que produziu ZP_01644857

Tipo de éster:	$C_2C_{12:1}$ mg/L	$C_2C_{12:0}$ mg/L	$C_2C_{14:1}$ mg/L	$C_2C_{14:0}$ mg/L	$C_2C_{16:1}$ mg/L	$C_2C_{16:0}$ mg/L	$C_2C_{18:1}$ mg/L	$C_2C_{18:0}$ mg/L	Total mg/L[c]
Controle[a]	0,0	0,0	0,0	1,78	9,80	5,65	33,7	0,00	50,93
fadD ZP_01644857[b]	1,49	3,57	3,68	33,22	52,77	43,09	91,11	10,08	239,01

[a] Controle: cepa BL21(DE3) D fadE, contendo plasmídeos pETDuet-1-'TesA, pHZ1.97 e pCL1920.

[b] Cepa BL21(DE3) D fadE, contendo plasmídeos pETDuet-1-'TesA, pHZ1.97 e pDS7.

[c] Esses valores representam a média de 3 culturas.

EXEMPLO 18. REPRESSÃO DE BETA-OXIDAÇÃO

Esse exemplo descreve a criação de uma *E. coli* cepa MG1655 Δ*fadE* Δ*ydiO*.

A degradação de ácido graxo pode ser eliminada ou atenuada através da atenuação de qualquer uma das reações enzimáticas de β-oxidação descritas aqui (*veja,* **FIG. 1**). Por exemplo, a *E. coli* cepa MG1655 Δ*fadE* pode ser adicionalmente engenheiradas utilizando oligos para amplificar a montante de *ydiO* e oligos adicionais para amplificar a jusante de *ydiO*. PCR de sobreposição pode então ser utilizado para criar uma construção para uma deleção em fase do gene *ydiO* completo. A construção de deleção de *ydiO* é então clonada em um plasmídeo sensível a temperatura pKOV3, que contém um gene *sacB* para contra-seleção. Uma deleção cromossomal de *ydiO* é então feita de acordo com o método de *Link et al.*, J. Bact. 179:6228-6237, 1997. A cepa resultante não é capaz de degradar ácidos graxos e acil-CoAs graxos. Métodos adicionais para gerar um duplo mutante nulo de *fadE* e *ydiO* são descritos, por exemplo, em *Campbell et al.*, Mol. Microbiol. 47:793-805, 2003.

Também é possível evitar a degradação de ácido graxo através de seleção ou emprego de um hospedeiro de produção que não contenha a via de β-oxidação. Por exemplo, várias espécie de *Streptococcus* foram sequenciadas e nenhum gene de β-oxidação foi encontrado.

EXEMPLO 19. IDENTIFICAÇÃO DE ÉSTER SINTASES ADICIONAIS

Esse exemplo provê éster sintases adicionais e métodos de utilização de tais sintases para produção de ésteres graxos.

Utilizando bioinformática, éster sintases adicionais foram identificadas. Essas éster sintases contêm motivos que diferem de outros motivos conhecidos, tais como os motivos encontrados em ADP1. As diferenças nos motivos são notados na **Tabela 19**, abaixo.

Tabela 19: Comparação de motivos de éster sintase

Motivos ADP1	HHAXVDGV	NDVVLA	GALRXYL	PLXAMVP	ISNVPGP	REPLYXNGA
Proteína hipotética BCG_3544c [Mycobacterium bovis BCG str. Pasteur 1173P2] gi/121639399	HHSLIDGY	NDVALA	GGLRRFL	SLIVVLP	VSNVPGP	EDVLYLRGS
Proteína de função desconhecida UPF0089 [Mycobacterium gilvum PYR-GCK] gi/145221651	HHALVDGY	NDVALA	GGLRKFL	SLIAFLP	VSNVPGP	REPLYFNGS
Proteína de função desconhecida UPF0089 [Mycobacterium vanbaalenii PYR-1] gi/120406715	HHALVDGY	NDVALA	GGLRKFL	SLIAFLP	VSNVPGP	REPLYFNGS

As sequências identificadas podem ser clonadas utilizando técnicas padrão de biologia molecular. Essas sequências podem ser expressas utilizando os vetores descritos aqui e utilizados para fazer vários ésteres graxos. Os motivos podem também ser utilizados para identificar outras éster sintases.

EXEMPLO 20. CARACTERIZAÇÃO DE PRODUTO

Para caracterizar e quantificar os alcoóis graxos e ésteres graxos, cromatografia de gases (GC) acoplada com detecção de espectro de massa (MS) de impacto de elétron foi utilizada. Amostras de álcool graxo foram primeiro derivatizadas com um excesso de N-trimetilsilil (TMS) imidazol para aumentar a sensibilidade de detecção. Ésteres graxos não requerem derivatização. Derivados de álcool graxo-TMS e ésteres graxos foram dissolvidos em um solvente volátil apropriado, tal como, por exemplo, acetato de etila.

As amostras foram analisadas em uma coluna de capilar de 30 m DP-5 utilizando o seguinte método. Após uma injeção "splitless" de 1 µl na coluna de GC/MS, o forno foi mantido a 100°C por 3 minutos. A temperatura foi gradualmente aumentada para 320°C a uma taxa de 20°C/minuto. O forno foi mantido a 320°C por 5 minutos adicionais. A taxa de escoamento do gás hélio carreador foi de 1,3 mL/minuto. O quadrupolo de MS varreu de 50 a 550 m/z. Tempos de retenção e padrões de fragmentação dos picos de produto foram comparados com referências autênticas para confirmar identidade de pico.

Por exemplo, etil éster de ácido hexadecônico eluiu a 10,18 minutos (**Figs. 14A-B**). O íon parental de 284 unidades de massa foi prontamente observado. Mais abundante foram os íons filhos produzidos durante a fragmentação de massa. O íon filho mais prevalente foi o de 80 unidades de massa. O hexadeconol-TMS de álcool graxo derivatizado eluiu a 10,29 minutos e o íon parental de 313 foi observado. O íon mais prevalente foi o íon M-14 de 299 unidades de massa.

Quantificação foi conduzida através de injeção de várias concentrações das referências autênticas apropriadas utilizando o método GC/MS como descrito aqui. Essa informação foi utilizada para gerar uma curva padrão com resposta (contagem de íon integrada total) versus concentração.

EXEMPLO 21. IDENTIFICAÇÃO E RECLASSIFICAÇÃO DE UM MICROORGANISMO PERTENCENTE AO GÊNERO *JEOTGALICOCCUS* QUE É UM PRODUTOR DE α-OLEFINA

Micrococcus candicans ATCC 8456 foi previamente reportado a sintetizar hidrocarbonos alifáticos com comprimentos de cadeia de carbono variando de C_{18} a C_{20} (*Morrison et al.*, J. Bacteriol. 108:353-358, 1971). Para identificar os hidrocarbonos produzidos por essa cepa, células ATCC 8456 foram cultivadas em 15 mL de meio TSBYE (3% de caldo de Soja Tríptica + 0,5% de Extrato de Levedura), por 40-48 horas a 30 °C. Células proveniente de 5 mL de cultura foram precipitadas, ressuspendidas em 1 mL de metanol, sonicadas por 30 minutos, e extraídas com 4 mL de hexano. Após evaporação do solvente, amostras foram ressuspendidas em 0,1 mL de hexano e analisadas através de GC-MS. Os hidrocarbonos foram identificados a ser as seguintes α-olefinas: 15-metil-1-heptadeceno (a-C_{18}), 16-metil-1-heptadeceno (i-C_{18}), 1-nonadeceno (n-C_{19}), 17-metil-1-nonadeceno (a-C_{20}) e 18-metil-1-nonadeceno (i-C_{20}) (veja **FIG. 17** (i=iso, a=anteiso, n=cadeia simples) e **FIG. 36**).

Baseado nas seguintes análises, foi determinado que ATCC 8456 foi previamente erroneamente identificada como pertencente ao gênero *Micrococci*. A classificação filogenética de ATCC 8456 foi re-acessada através de amplificação e sequenciamento do gene

parcial 16s utilizando oligos Eubac27 e 1492R (*veja DeLong et al.*, PNAS 89:5685, 1992). A sequência de 16s rRNA de ATCC8456 foi analisada utilizando o programa de classificação do Ribosomal Database Project II (http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp). Baseado nessa análise, a cepa foi identificada como pertencente ao gênero *Jeotgalicoccus*. O gênero *Jeotgalicoccus* foi previamente descrito (*Jung-Hoon et al.*, Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53:595-602, 2003).

Análise adicional utilizando o conteúdo G+C de ATCC 8456 foi conduzida. *Jeotgalicoccus* são bactérias Gram-positiva de baixo conteúdo G+C relacionadas ao gênero *Staphylococcus* (*veja* Figura 20). *Micrococci,* por outro lado, são bactérias Gram-positivas de alto conteúdo G+C. As extremidades de vários clones proveniente de uma biblioteca de cosmídeo do DNA genômico de ATCC 8456 foram sequenciadas. Baseada na sequência de DNA de por volta de 4.000 pb, o conteúdo G+C foi determinado a ser por volta de 36%. Buscas de sequência nucleotídica contra banco de dados de proteína não redundante revelaram que todas as sequências com identificação com uma entrada do banco de dados eram similares a proteínas de bactérias Gram-positiva de baixo conteúdo G+C, tais como espécies pertencendo ao gênero *Staphylococcus* ou *Bacillus*, porém não de espécies pertencendo ao gênero *Micrococcus*.

Após, uma análise do genoma inteiro de ATCC 8456 foi conduzido. Baseado em uma sequência de DNA de por volta de 2,1 MB, o conteúdo G+C do genoma inteiro foi determinada a ser por volta de 36,7%. Em contraste, bactéria do gênero *Micrococcus* são conhecidas a apresentar genomas com alto conteúdo G+C, *ex.*, o

genoma de *Micrococcus luteus* NCTC 2665 apresenta um conteúdo G+C de 72,9% (Nº de Acesso do GenBank ABLQ01000001-68). Baseado na análise de conteúdo de G+C, foi determinado que o microorganismo ATCC 8456 não pertence ao gênero *Micrococcus*.

Cepa adicionais de *Jeotgalicoccus* forma também examinadas para determinar se eles produzem α-olefinas. As seguintes cepas de *Jeotgalicoccus* foram examinadas: *Jeotgalicoccus halotolerans* DSMZ 17274, *Jeotgalicoccus psychrophilus* DSMZ 19085, e *Jeotgalicoccus pinnipedalis* DSMZ 17030. Cada cepa foi cultivada em 15 mL de meio TSBYE (3% de caldo de Soja Tríptica + 0,5% de Extrato de Levedura) e os hidrocarbonos foram isolados e analisados através de GC-MS como descrito acima. Todas as três cepas produziram α-olefinas similares àquelas produzidas por ATCC 8456 (**FIGS. 17B, 17C** e **17D** representam traços GC-MS para hidrocarbonos produzidos por células *Jeotgalicoccus halotolerans* DSMZ 17274, células *Jeotgalicoccus pinnipedalis* DSMZ 17030, e células *Jeotgalicoccus psychrophilus* DSMZ 19085, respectivamente). Esses dados indicam que a habilidade de produzir α-olefinas é espalhada ao longo do gênero *Jeotgalicoccus*.

EXEMPLO 22. PRODUÇÃO DE NÍVEIS AUMENTADOS DE OLEFINAS E α-OLEFINAS NÃO NORMALMENTE PRODUZIDAS POR CÉLULAS ATCC 8456 UTILIZANDO ALIMENTAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS

Os ácidos graxos ácido eicosanóico (ácido graxo C_{20} de cadeia simples), ácido 16-metil octadecanóico e ácido 17-metil octadecanóico (ácidos graxos C_{19} de cadeia ramificada) foram identificado como componentes dos lipídeos de ATCC 8456. Esses ácidos graxos foram deduzidos a ser precursores diretos, após

decarboxilação, para biossíntese de 1-nonadeceno, 15-metil-1-heptadeceno e 16-metil-1-heptadeceno, respectivamente. Com o intuito de melhorar a produção de α-olefina para produzir olefinas não normalmente produzidas por células ATCC 8456, experimentos de alimentação de ácido graxo foram conduzidos como descrito abaixo.

Células ATCC 8456 foram cultivadas em 15 mL de um meio TSBYE (contendo 3% de caldo de Soja Tríptica + 0,5% de Extrato de Levedura). Ácidos graxos foram adicionados ao meio de cultura a uma concentração final de 0,5 g/L (0,05%). Após crescimento para 40-48 hrs a 30 °C, células provenientes de 5 mL de cultura foram precipitadas, ressuspendidas em 1 mL de metanol, sonicadas por 30 minutos e extraídas com 4 mL de hexano. Após evaporação de solvente, amostras foram ressuspendidas em 0,1 mL hexano e analisadas através de GC-MS.

Quando culturas foram alimentadas com ácido eicosanóico, um aumento na produção de 1-nonadeceno de por volta de 18 vezes foi observado (*veja* **FIG. 21A**; traços pretos representam sem e traços cinza representam com alimentação de ácido graxo). Quando culturas foram alimentadas com ácido esteárico ou ácido palmítico, um aumento na produção de α-olefinas 1-pentadeceno e 1-heptadeceno, respectivamente, foi observado (*veja* **FIG. 21B**). Essas olefinas não são normalmente produzidas pelas células ATCC 8456. Isso indicou que ácidos graxos eram os precursores diretos para α-olefinas e que bactéria *Jeotgalicoccus* pode ser utilizado para converter enzimaticamente ácidos graxos em α-olefinas *in vivo*.

Alternativamente, células *Jeotgalicoccus* em repouso podem

ser alimentadas com vários ácidos graxos para alcançar resultados similares.

EXEMPLO 23. SÍNTESE *IN VITRO* DE α-OLEFINAS UTILIZANDO EXTRATOS CELULARES E PROTEÍNAS PARCIALMENTE PURIFICADAS

Um extrato livre de células de ATCC 8456 foi utilizado para converter ácidos graxos livres em α-olefinas. O extrato livre de células foi gerado utilizando o seguinte procedimento: células ATCC 8456 foram cultivadas em um meio TSBYE (contendo 3% de caldo de Soja Tríptica + 0,5% de Extrato de Levedura) a 30 °C por 24 hrs com agitação. As células foram então precipitadas a partir da cultura através de centrifugação a 3.700 rpm por 20 minutos. O precipitado celular foi então ressuspendido em tampão Tris 50 mM pH 7,5 com 0,1 M de NaCl e 2,0 mM de ditiotreitol a uma concentração de 0,1 g/mL de células. A essa pasta fluida celular, 200 unidades/mL de lisostafina (Sigma) foram adicionadas em gelo. A reação de lise celular continuou por 30 minutos. As células foram então sonicadas a 12 W em gelo por três ciclos de 1,5 segundos de sonicação seguido por 1,5 segundos de descanso. A sonicação durou um total de 9 segundos. Esse procedimento foi repetido 5 vezes com um intervalo de 1 minuto entre ciclos de sonicação. As células lisadas foram então submetidas a centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos para precipitar os restos celulares. O sobrenadante (extrato livre de células) foi removido e utilizado para a conversão de ácidos graxos livres em α-olefinas.

Após obtenção de extrato livre de célula, os ácidos graxos livres ácido esteárico e ácido eicosanóico foram convertidos em α-olefinas utilizando o extrato livre de células como descrito

abaixo. Primeiro, uma solução estoque de estearato de sódio ou potássio 5% foi feita em solução de Tergitol 1% (Sigma, St. Louis, MO, EUA). Próximo, 6 µl da solução estoque foram adicionados a 1 mL do extrato livre de células a temperatura ambiente para obter uma concentração final de sal de ácido graxo livre 1 mM. A reação foi conduzida a temperatura ambiente por 3 hrs. As α-olefinas foram recuperadas através de adição de 200 µl de acetato de etila à mistura, utilizando um vórtex brevemente, centrifugando brevemente, e então removendo a fase orgânica. As α-olefinas foram identificadas e/ou detectada através de GC/MS.

FIG. 22 mostra o traço de GC/MS para os produtos resultantes. Na amostra 1, nenhum ácido esteárico foi adicionado ao extrato livre de célula. Na amostra 2, o extrato livre de células foi substituído por tampão Tris 50 mM pH 7.5 com cloreto de sódio 0,1 M ao qual ácido esteárico foi adicionado. Na amostra, ácido esteárico foi adicionado ao extrato livre de células. O pico a 7,62 minutos apresentou o mesmo tempo de retenção e o mesmo espectro de massa que 1-heptadeceno (Sigma). Quando ácido eicosanóico foi adicionado sob condições similares, 1-nonadeceno foi formado.

Fervura do extrato livre de células eliminou a produção de α-olefinas mediante adição de ácidos graxos livres. Esse dado sugere fortemente que o produto de catálise de ATCC 8456 era baseado em proteína.

O extrato livre de células de ATCC 8456 não requereu co-fatores adicionais para produzir α-olefinas. Quando o extrato livre de células foi suplementado com vários co-fatores em concentrações de 1 mM, nenhum aumento na síntese de α-olefina

foi observado. Os co-fatores examinados foram NAD+, NADP+, NADH, NADPH, $FADH_2$, SAM, ATP, e CoA. Em adição, Mg^{2+} foi examinado, porém a uma concentração de 10 mM. O requerimento de cofator foi também testado através de diálise do extrato livre de células com uma membrana com limite de exclusão de 10 kDa por 1,5 hrs em um volume que era 200 vezes maior que o volume do extrato celular utilizando um tampão de diálise: 50 mM de Tris, pH 7,5 com cloreto de sódio 0,1 M. Nenhum decréscimo na síntese de α-olefina foi observado após diálise. Adicionalmente, nenhum decréscimo na síntese de α-olefina foi observado quando 10 mM de EDTA pH 7,5 foi adicionado à mistura de reação.

O extrato livre de células de ATCC 8456 foi adicionalmente enriquecido através de condução de precipitação por sulfato de amônia. Primeiro, sulfato de amônia suficiente foi adicionado ao extrato livre de células para trazer a concentração de sulfato de amônio a saturação de 50% (wt/vol). A mistura foi homogeneizada gentilmente em gelo por 60 minutos e então centrifugada a 13.000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante foi recuperado e sulfato de amônia adicional foi adicionado para trazer a concentração de sulfato de amônia a 65% (wt/vol). A mistura foi permitida a misturar em gelo por 60 minutos e foi novamente centrifugada por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado. O precipitado foi então ressuspendido em tampão Tris 50 mM pH 7,5 com cloreto de sódio 0,1 M. Essa mistura foi então dialisada no tampão previamente mencionado para remover o sulfato de amônia. O extrato livre de células.

EXEMPLO 24. PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE UMA PROTEÍNA QUE CONVERTE ÁCIDOS GRAXOS EM α-OLEFINAS

Para isolar a proteína necessária para produção de α-olefina a partir de células ATCC 8456, o seguinte procedimento de purificação de proteína foi conduzido. Primeiro, 6 L de células ATCC 8456 foram cultivados em meio TSBYE a 30°C por 24 horas com agitação. As células foram precipitadas através de centrifugação a 3.700 rpm por 20 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi descartado. O precipitado celular foi ressuspendido em uma solução de 100 mL de 50 mM de Tris pH 8,0, 0,1 M de NaCl, 2,0 mM de DTT, e inibidores de protease bacteriano. A pasta fluida celular foi então passada por uma prensa francesa uma vez a uma pressão de 30.000 psi. Após, a pasta fluida celular foi sonicada como descrita no Exemplo 3 para quebrar o DNA. O extrato livre de células foi centrifugado a 10.000 rpm por 60 minutos a 4°C. O sobrenadante foi então removido e sulfato de amônia foi adicionado a uma concentração final de 50% (wt/vol). A mistura foi gentilmente homogeneizada a 4°C por 60 minutos e então centrifugada a 10.000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante foi então removido e sulfato de amônia adicional foi adicionado à saturação de 65% (wt/vol). A mistura foi homogeneizada novamente por 60 minutos a 4°C e centrifugada a 10.000 rpm por 30 min. O sobrenadante foi descartado. O precipitado restante foi ressuspendido em 50 mL de Tris 50 mM pH 8,0 e 2,0 mM de DTT.

A mistura foi passada através de uma coluna de 5 mL HiTrap SP (GE Healthcare) a 3 mL/min e 4°C. Os seguintes tampões foram utilizados como um gradiente de eluição: tampão A continha Tris 50 mM pH 8,0 e 2,0 mM de DTT; tampão B continha Tris 50 mM pH 8,0, 1,0 M de NaCl, e DTT 2,0 mM. Após a coluna ter sido carregada com a mistura, a coluna foi lavada com tampão B 40%. Depois um gradiente de 20 minutos de tampão B 40% a tampão B 100% a 3,0

mL/min foi conduzido. Frações de 5 mL foram coletados durante o gradiente de eluição. Cada fração foi testada para atividade como descrito no Exemplo 3. Frações contendo atividade de produção de α-olefina tipicamente eluiu entre concentração de 600 e 750 mM de NaCl. Frações contendo atividade foram então reunidas e dialisadas em tampão A.

A fração de proteína dialisada foi então carregada em uma coluna de 1 mL ResourceQ (GE Healthcare) a 4 mL/min a 4°C. Tampão B utilizado com a coluna HiTrap SP foi também utilizado para a coluna ResourceQ. Um gradiente de eluição de 7 minutos entre tampão B 0% e tampão B 25% foi corrido a 4 mL/min. Frações de 1,5 mL foram coletados e testados para atividade. Frações ativas eluíram entre concentrações de 150 e 200 mM de NaCl. Frações contendo atividade foram então reunidas e concentradas com um concentrador de proteína Millipore Amicon (4 mL e limite de exclusão de 10 kDa) para por volta de 50 µL. A concentração de proteína aproximada foi determinada com um ensaio de Bradford (Bio-Rad). Concentrações finais de proteína variaram de por volta de 5 mg/mL a por volta de 10 mg/mL. 30 µL de proteína foi então aplicados em um gel SDS PAGE (Invitrogen) juntamente com um marcador de peso molecular de proteína apropriado. O gel foi corado com corante Simple Safe Coomassie (Invitrogen). **FIG. 23** representa um gel representativo. Duas bandas intensas de proteína a 50 kDa e 20 kDa foram observadas.

Para determinar a identidade das bandas de proteínas, as bandas foram excisadas do gel, digeridas com tripsina, e analisadas utilizando LC/MS/MS. O dado de LC/MS/MS foi analisado utilizando o programa Mascot (*Mann et al.*, Anal. Chem. 66:4390-

4399, 1994). O genoma de ATCC 8456 foi sequenciado. O dado genômico foi utilizado para interpretar o dado de LC/MS/MS e para determinar a identidade das bandas de proteína. A banda de 50 kDa apresentou uma forte correlação com ORF880. A pontuação Mascot designada a essa correlação foi 919, uma pontuação alta. Além disso, ORF880 apresenta um peso molecular predito de 48.367 Da. As sequências nucleotídicas e de aminoácidos de *orf880* são apresentadas nas **SEQ ID NO:25 e SEQ ID NO:26**, respectivamente.

EXEMPLO 25. EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA *ORF880* DE *JEOTGALICOCCUS* ATCC 8456 EM *E. COLI*

A Orf880 de *Jeotgalicoccus* ATCC 8456 foi identificada como uma das duas principais proteínas em uma fração enzimática altamente purificada que catalisou a conversão de ácidos graxos livres em α-olefinas. O DNA genômico codificando ATCC 8456_*orf880* foi clonado em pCDF-Duet1 sob o controle do promotor T7, e *E. coli* foi transformada com vários vetores, como descrito abaixo. As células de *E. coli* foram cultivadas e os hidrocarbonos produzidos pelas células foram analisados como descrito no Exemplo 23. Quando 0,05% de ácido esteárico foi alimentado ás culturas de *E. coli* transformadas com o vetor contendo 8456_*orf880*, a expressão de 8456_*orf880* levou à formação de 1-heptadeceno em *E. coli* (*veja* **FIG. 24** , que representa traços de GC/MS de α-olefinas provenientes de *E. coli* tanto com (cinza) quanto sem (preto) expressão de 8456_*orf880*). Em contraste, a adição de 0,05% de ácido esteárico às culturas de *E. coli* transformadas com o controle de vetor (não contendo ATCC_*orf880*) não resultou na produção de 1-heptadeceno. Isso demonstrou que 8456_*orf880* sintetizou α-olefinas a partir de ácidos graxos

livres em uma *E. coli* hospedeira heteróloga. Esse resultado indica que a biossíntese de α-olefina pode ser desempenhada em organismos heterólogos. Adicionalmente, quando células de *E. coli* expressando a proteína de 8456_*orf880* foram alimentadas com 0,05% de ácido palmítico ou 0,05% de ácido eicosanóico, a produção de 1-pentadeceno ou 1-nonadeceno, respectivamente, foi observada.

EXEMPLO 26. SÍNTESE *IN VITRO* DE α-OLEFINAS UTILIZANDO ORF880 EXPRESSA DE MANEIRA HETERÓLOGA EM E PURIFICADA A PARTIR DE *E. COLI*

O DNA genômico codificando ATCC8456_*orf880* foi clonado nos sítios NdeI e XhoI do vetor pET15b (Novagen) sob o controle de um promotor T7 para expressão em e purificação a partir de *E. coli*. Esse plasmídeo expressou uma versão com His-tag na porção N-terminal da 8456_*orf880*.

Uma *E. coli* cepa BL21 (DE3) (Invitrogen) foi transformada com pET15b-ORF 880 utilizando técnicas rotineiras de transformação química. Expressão de proteína foi conduzida através de, primeiro, inoculação de uma colônia da cepa de *E. coli* em 5 mL de meio LB suplementado com 100 mg/L de carbenicilina e agitação durante a noite a 37°C para produzir uma cultura inicial. Essa cultura inicial foi utilizada para inocular 1 L de um meio LB suplementado com 100 mg/L de carbenicilina. A cultura foi agitada a 37°C até ela atingir um valor de DO_{600} de 0,6. A cultura foi colocada em gelo por 10 minutos antes de IPTG ter sido adicionado a uma concentração final de 250 μM. A cultura foi então agitada a 18°C por aproximadamente 18 horas. A cultura foi então centrifugada a

3.700 rpm por 20 minutos a 4°C. O precipitado foi ressuspendido em 30 mL de tampão contendo tampão fosfato de sódio 100 mM a pH 7,2, suplementado com Bacterial ProteaseArrest (GBiosciences). As células foram sonicadas a 12 W em gelo por 9 segundos com 1,5 segundos de sonicação seguido por 1,5 segundos de descanso. Esse procedimento foi repetido 5 vezes com intervalos de 1 minuto entre cada ciclo de sonicação. O extrato livre de células foi centrifugado a 10.000 rpm por 30 minutos a 4°C. 5 mL de Ni-NTA (Qiagen) foi adicionado ao sobrenadante e a mistura foi gentilmente homogeneizada a 4°C. A pasta fluida foi passada pro uma coluna para remover a resina do lisado. A resina foi então lavada com 30 mL de tampão contendo tampão fosfato de sódio 100 mM a pH 7,2, e imidazol 30 mM. Finalmente, a proteína foi eluída com 15 mL de tampão fosfato de sódio 100 mM a pH 7,2 mais imidazol 250 mM. A solução de proteína foi dialisada com 200 volumes de tampão fosfato de sódio 100 mM a pH 7,2. Concentração de proteína foi determinada utilizando o ensaio de Bradford (Bio-Rad). 125 µg/mL de proteína foi obtido.

Para testar a especificidade de substrato de ácido graxo *in vitro* de ORF880, sais de potássio dos seguintes ácidos graxos foram preparados: ácido tetradecanóico, ácido hexadecanóico, ácido octadecanóico, ácido eicosanóico, e ácido behênico (Sigma). As soluções de ácido graxo foram feitas com etanol e 2% de solução Tergitol (Sigma, St. Louis, MO, EUA) a uma concentração final de 20 mM.

A cinética da reação de decarboxilação e produção foi determinada. Uma mistura de reação de 200 µl foi preparada contendo os seguintes reagentes: 1,25 µM de ORF880, 200 µM de

octadecanoato de potássio, 200 µl de ditiotreitol , e tampão fosfato de sódio 100 mM a pH 7,2. A mistura de reação foi incubada a temperatura ambiente e pontos de tempo foram tirados em duplicadas entre 5 minutos e 120 minutos. A reação foi esmorecida e extraída através de adição de 100 µl de acetato de etila contendo 1-octadeceno a 5 mg/L como uma referência interna. Amostras foram analisadas utilizando GC/MS utilizando o método alkane 1 splitless, utilizando os seguintes parâmetros: tempo de corrida: 20 min; coluna: HP-5-MS Part No. 19091S-433E (comprimento de 30 metros; I.D.: 0,25 mm narrowbore; filme: 0,25µM); amostra: extração padrão de acetato de etila; injeção: 1 µl de entrada Agilent 6850; entrada: 300°C splitless; gás carreador: hélio; escoamento: 1,3 mL/min; temperatura do forno: 100°C mantido por 5 min, 320 a 20°C/min, 320 mantido por 5 min; det: Agilent 5975B VL MSD; det. temp: 300°C; varredura: 50-500 M/Z. Curvas de calibração foram gerados utilizando 1-heptadeceno dissolvido em acetato de etila. Baseado nessa análise, a produção do produto foi determinada a ser linear de 5 minutos a 60 minutos.

Para testar as taxas de reação de diferentes substratos de ácido graxo, as seguintes misturas de reação de 200 µl foram preparadas: enzima ORF 880 1 µM, 200 µM de sal teste de ácido graxo, 200 µl de ditiotreitol, e 100 mM de tampão fosfato de sódio a pH 7,2. As reações foram conduzidas a temperatura ambiente e pontos de tempo foram tirados em triplicatas a 20 minutos e 47 minutos utilizando os procedimentos de extração e análise como descrito acima. Curvas de referência foram geradas utilizando padrões químicos disponíveis. Em alguns exemplos, os padrões químicos não estavam disponíveis. Sob aquelas

circunstâncias, por exemplo, *cis*-9-heneicoseno foi utilizado como uma referência para 1-heneicoseno, e 9-tricoseno foi utilizado como uma referência para 1-tricoseno. Atividades foram calculadas através da diferença entre as concentrações médias de α-olefina para cada substrato a 47 minutos e 20 minutos e então dividindo a diferença pelo do ponto de 27 minutos. Os resultados estão resumidos na Tabela 20.

Tabela 20: Atividade de ORF880 com os diferentes substratos de ácido graxo

Substrato	Atividade (nM alceno produzido/min)
ácido tetradecanóico	22,9
ácido hexadecanóico	181,9
ácido octadecanóico	77,2
ácido eicosanóico	19,7
ácido behênico	30,6

Esses resultados demonstraram que ORF880 expressa de maneira heteróloga foi capaz de converter substratos de ácido graxo em olefinas *in vitro*. Esses dados também mostraram que ORF880 apresentou atividade maior quando ácido hexadecanóico foi o substrato de ácido graxo.

EXEMPLO 27. PRODUÇÃO DE α-OLEFINAS A PARTIR DE GLICOSE ATRAVÉS DE EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE *JEOTGALICOCCUS* ATCC 8456 *ORF880* EM *E. COLI* MG1655 *ΔFadD*

Construção de cepa de deleção de *fadD*

O gene *fadD* de *E. coli* MG1655 foi deletado utilizando o sistema lambda red (*Datsenko et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97: 6640-6645, 2000) como se segue:

O gene da cloramfenicol acetiltransferase proveniente de pKD3 foi amplificado utilizando os oligos fad1: 5`-TAACCGGCGTCTGACGACTGACTTAACGCTCAGGCTTTATTGTCCACTTTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG-3` (SEQ ID NO:43); e

fad2: 5`-CATTTGGGGTTGCGATGACGACGAACACGCATTTTAGAGGTGAAGAATTGCATATGAATATCCTCCTTTAGTTCC-3`(SEQ ID NO:44). Esse produto de PCR foi eletroporado em *E. coli* MG1655 (pKD46). As células foram plaqueadas em L-cloramfenicol (30 µg/mL)(L-Cm) e cultivadas durante a noite a 37°C. Colônias individuais foram selecionadas e plaqueadas em outra placa L-Cm e cultivadas a 42°C. Essas colônias foram transferidas para placas L-Cm e L- carbenicilina (100 mg/mL) (L-Cb) e cultivadas a 37°C durante a noite. Colônias que eram Cm^R e Cb^S foram avaliadas adicionalmente através de PCR para garantir que o produto de PCR inseriu no sítio correto. Verificação de PCR foi desempenhado em lisados de colônias dessas bactérias utilizando oligos fadF: 5`- CGTCCGTGGTAATCATTTGG-3`(SEQ ID NO:45); e fadR: 5`-TCGCAACCTTTTCGTTGG-3`(SEQ ID NO:46). O tamanho esperado da deleção Δ*fadD*::Cm foi de por volta de 1200 pb (**FIG. 9**). O gene de resistência a cloramfenicol foi eliminado utilizando um plasmídeo "helper" FLP como descrito em *Datsenko et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97: 6640-6645, 2000. Verificação por PCR da deleção foi desempenhado com os oligos fadF e fadR. A cepa MG1655 Δ*fadD* não foi capaz de crescer em placas de ágar M9 + oleato (oleato como fonte de carbono). Ela também não foi capaz de crescer em meio líquido M9 + oleato.

Expressão de Jeotgalicoccus ATCC 8456 orf880 em *E. coli* MG1655 Δ*fadD*

O DNA genômico codificando ATCC 8456_orf880, que teve códon otimizado para expressão em *E. coli*, foi clonado em vetor OP80 (derivado de pCL1920) sob o controle de um promotor P_{trc}, e *E. coli* MG1655 *ΔfadD* foi transformada com o vetor resultante. As células de *E. coli* foram cultivadas a 37°C em um meio mineral M9 suplementado com 20 µg/mL de uracila e 100 µg/mL de espectinomicina. Glicose (1%, w/v) foi a única fonte de carbono e energia. Quando a cultura atingir uma DO_{600} de 0,8 a 1,0, IPTG (1 mM) foi adicionado e a temperatura foi alterada para 25°C. Após crescimento por 18 a 24 horas adicionais a 25°C, células a partir de 10 mL de cultura foram precipitadas, ressuspendidas em 1 mL de metanol, sonicadas por 30 minutos, e extraídas com 4 mL de hexano. Após evaporação de solvente, amostras foram ressuspendidas em 0,1 mL de hexano e analisada através de GC-MS. Em contraste com o controle contendo somente o vetor, células de *E. coli* transformadas com o vetor contendo o*rf880* produziu as α-olefinas 1-pentadeceno e heptadecadieno. Esse resultado indica que a expressão de ORF880 confere a habilidade para biossintetizar α-olefinas para *E. coli* quando cultivadas em glicose, e que os precursores diretos são os ácidos graxos mais abundantes em *E. coli*, chamados ácido hexadecanóico e ácido vacênico (ácido 11-*cis*-octadecenóico).

EXEMPLO 28. IDENTIFICAÇÃO DE HOMÓLOGOS DE ÁCIDO CARBOXÍLICO REDUTASE (CAR)

A ácido carboxílico redutase (CAR) proveniente de *Nocardia sp.* cepa NRRL 5646 pode reduzir ácidos carboxílicos em aldeídos correspondentes sem separar enzimas de ativação, tais como acil-CoA sintases (*Li et al.*, J. Bacteriol. 179:3482-3487, 1997; *He et*

al., Appl. Environ. Microbiol. 70:1874-1881, 2004)). Uma busca com BLAST utilizando a sequência de aminoácidos NRRL 5646 CAR (Nº de Acesso do Genpept AAR91681) como a sequências isca identificou por volta de 20 sequências homólogas. Três homólogos, listados na **Tabela 21**, foram avaliados em relação a suas habilidades de converter ácidos graxos em aldeídos graxos *in vivo* quando expressos em *E. coli*. Em relação a sequência nucleotídica, *carA*, *carB*, e *fadD9* (demonstraram 62,6%, 49,4%, e 60,5% de homologia, respectivamente, com o gene *car* (AY495697) de *Nocardia sp.* NRRL 5646. Em relação a sequência de aminoácido, CARA, CARB, e FadD9 demonstraram 62,4%, 59,1% e 60,7% de identidade, respectivamente, com CAR de *Nocardia sp.* NRRL 5646.

Tabela 21: Proteína CAR-like e as correspondentes sequências codificantes.

Acesso do Genpept	Locus_tag	Anotação no GenBank	Nome do gene
NP_217106	Rv 2590	Provável ácido graxo-CoA ligase (FadD9)	*fadD9*
ABK75684	MSMEG 2956	proteína da família NAD dependente epimerase/desidratase	*carA*
YP_889972.1	MSMEG 5739	proteína da família NAD dependente epimerase/desidratase	*carB*

EXEMPLO 29. EXPRESSÃO DE HOMÓLOGOS CAR EM *E. COLI*

Construção de Plasmídeo

Três plasmídeos de expressão de *E. coli* foram construídos para expressar os genes codificando os homólogos CAR listado na **Tabela 22**, abaixo. Primeiro, *fadD9* foi amplificado a partir de

DNA genômico de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (obtido da University of British Columbia, and Vancouver, BC Canada) utilizando os oligos fadD9F e FadDR (*veja* **Tabela 22**). O produto de PCR foi primeiro clonado em PCR-blunt (Invitrogen) e então liberado como um fragmento NdeI-AvrII. O fragmento NdeI-AvrII foi então clonado entre os sítios NdeI e AvrII de pACYCDuet-1 (Novogen) para gerar pACYCDuet-1-*fadD9*.

Os genes *carA* e *carB* foram amplificados a partir de DNA genômico de *Mycobacterium smegmatis* MC2 155 (obtido a partir de ATCC (ATCC 23037D-5)) utilizando oligos CARMCaF e CARMCaR ou CARMCbF e CARMCbR, respectivamente (*veja,* **Tabela 22**). Cada produto de PCR foi primeiro clonado em PCR-blunt e então liberado como um fragmento NdeI-AvrII. Cada um dos dois fragmentos foi então sub-clonado entre os sítios NdeI e AvrII de pACYCDuet-1 (Novogen) para gerar pACYCDUET-*carA* e pACYCDUET-*carB*.

Tabela 22. Oligos utilizados para amplificar genes codificando homólogos de CAR

fadD9F	CAT ATGTCGATCAACGATCAGCGACTGAC (SEQ ID NO:47)
fadD9R	CCTAGG TCACAGCAGCCCGAGCAGTC (SEQ ID NO:48)
CARMCaF	CAT ATGACGATCGAAACGCG (SEQ ID NO:49)
CARMCaR	CCTAGG TTACAGCAATCCGAGCATCT (SEQ ID NO:50)
CARMCbF	CAT ATGACCAGCGATGTTCAC (SEQ ID NO:51)
CARMCbR	CCTAGG TCAGATCAGACCGAACTCACG (SEQ ID NO:52)

Avaliação de Produção de Aldeído Graxo

Plasmídeos codificando os homólogos CAR (pACYCDUET-*fadD9*, pACYCDUET-*carA*, e pACYCDUET-*carB*) foram separadamente co-transformados em *E. coli* cepa C41 (DE3, Δ*fadE*) (descrita em PCT/US08/058788) juntamente com pETDuet-1-'TesA (descrita em

PCT/US08/058788, as revelações das quais estão incorporadas aqui por referência).

As *E. coli* transformantes foram cultivadas em 3 mL de um meio LB suplementado com carbenicilina (100 mg/L) e cloramfenicol (34 mg/L) a 37°C. Após crescimento durante a noite, 15 µl de cultura foram transferidos em 2 mL de um meio LB fresco suplementado com carbenicilina e cloramfenicol. Após 3,5 horas de crescimento, 2 mL de cultura foram transferidas para frascos de 125 mL contendo 20 mL de um meio M9 com glicose 2% e com carbenicilina e cloramfenicol. Quando a DO_{600} da cultura atingiu 0,9, 1 mM de IPTG foi adicionado em cada frasco. Após 20 horas de crescimento a 37°C, 20 mL de acetato de etila (com 1% de ácido acético, v/v) foi adicionado com cada frasco para extrair os compostos orgânicos produzidos durante a fermentação. O extrato bruto de acetato de etila foi diretamente analisado com GC/MS como descrito abaixo. A co-expressão do 'TesA sem líder e qualquer um dos três genes *car* em *E. coli* resultou em produção detectável de aldeído graxo. Em uma fermentação, LS9001/pACYCDUET carB+ pETDuet-1-'TesA produziu uma média de 120 mg/L de aldeídos graxos. Os tempos de retenção eram de 6,959 minutos para dodecanal, 8,247 minutos para 7-tetradecenal, 8,37 minutos para tetradecanal, 9,433 minutos para 9-hexadecenal, 9,545 minutos para hexadecanal, e 10,945 minutos para 11-octadecenal. A presença de grandes quantidades de aldeídos graxos é consistentes com CAR sendo uma ácido graxo redutase geradora de aldeído (AFAR). Esse mecanismo é diferente do das acil-CoA graxo redutases (FAR) geradoras de álcool, por exemplo, JjFAR, e acil-CoA graxo redutases, tal como Acr1.

Preferência de Substrato de Homólogos de CAR

Preferências de substrato distintas foram observadas dentre os três homólogos CAR avaliados. FadD9 exibiu uma forte preferência para ácidos graxos C_{12} relativo a outros ácidos graxos com comprimentos de cadeia de carbono maiores que 12. Ambos CarA e CarB demonstraram variações de substrato mais amplas que FadD9.

Quantificação e Identificação de Aldeídos Graxos

Um experimento GC-MS foi desempenhado utilizando um sistema Agilent 5975B MSD equipado com uma coluna DB-5 de 30m×0,25mm (filme de 0,10µm). A temperatura foi de 3 minutos isotérmicos a 100°C. A coluna foi programada a aumentar de 100°C para 320°C a uma taxa de 20°C/min. Quando a temperatura final foi atingida, a coluna se manteve isotérmica por 5 minutos a 320°C. O volume de injeção foi de 1 µL. O gás carreador, hélio, foi liberado a 1,3 mL/min. O espectrômetro de massa foi equipado com uma fonte de ionização de impacto de elétron. A temperatura da fonte de ionização foi ajustada para 300°C.

Antes da quantificação, vários aldeídos foram identificados utilizando dois métodos. Primeiro, o tempo de retenção GC de cada composto foi comparado com o tempo de retenção de um padrão conhecido, tal como laurilaldeído (dodecanal). Segundo, identificação de cada composto foi confirmada através de comparação de espectro de massa do composto com o espectro de massa de um padrão na biblioteca de espectro de massa.

EXEMPLO 30. PRODUÇÃO DE ÁLCOOL GRAXO ATRAVÉS DE EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE HOMÓLOGOS CAR EM *E. COLI* MG1655 (DE3, *ΔFADD*)

Construção de cepa de deleção de *fadD*

O gene *fadD* de *E. coli* MG1655 foi deletado utilizando o sistema lambda red (*Datsenko et al.*, PNAS (USA). 97: 6640-6645, 2000) com se segue: O gene da cloramfenicol acetiltransferase de pKD3 foi amplificado com os oligos fad1: 5`-TAACCGGCGTCTGACGACTGACTTAACGCTCAGGCTTTATTGTCCACTTTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG-3`(SEQ ID NO:43); e fad2: 5`-CATTTGGGGTTGCGATGACGACGAACACGCATTTTAGAGGTGAAGAATTGCATATGAATATCCTCCTTTAGTTCC-3`(SEQ ID NO:44). Esse produto de PCR foi eletroporado em *E. coli* MG1655 (pKD46). As células foram plaqueadas em L-cloramfenicol (30 µg/mL) (L-Cm) e cultivados durante a noite a 37°C. Colônias individuais foram selecionadas e plaqueadas em outra placa L-Cm e cultivadas a 42°C. Essas colônias foram transferidas para placas L-Cm e L- carbenicilina (100 mg/mL) (L-Cb) e cultivadas a 37°C durante a noite. Colônias que eram Cm^R e Cb^S foram avaliadas adicionalmente através de PCR para garantir que o produto de PCR inseriu no sítio correto. Verificação de PCR foi desempenhado em lisados de colônias dessas bactérias utilizando oligos fadF: 5`- CGTCCGTGGTAATCATTTGG-3`(SEQ ID NO:45); e fadR: 5`-TCGCAACCTTTTCGTTGG-3`(SEQ ID NO:46). O tamanho esperado da deleção Δ*fadD*::Cm foi de por volta de 1200 pb. O gene de resistência a cloramfenicol foi eliminado utilizando um plasmídeo "helper" FLP como descrito em *Datsenko et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97: 6640-6645, 2000. Verificação por PCR da deleção foi desempenhado com os oligos fadF e fadR. A cepa MG1655 Δ*fadD* não foi capaz de crescer em

placas de ágar M9 + oleato (oleato como fonte de carbono). Ela também não foi capaz de crescer em meio líquido M9 + oleato. O defeito de crescimento foi complementado por um gene *fadD* de *E. coli* transferido em *trans* (em pCL1920-Ptrc).

Construção de cepa MG1655(DE3, ΔfadD)

Para gerar uma cepa responsiva a T7, o "kit" λDE3 Lysogenization (Novagen) foi utilizado, que é desenhado para integração sítio-específica do pró-fago λDE3 em um cromossomo hospedeiro de *E. coli*, de modo que o hospedeiro lisogenizado pode ser utilizado para expressar genes alvo clonados em vetores de expressão T7. λDE3 é um fago recombinante carregando o gene clonado para a T7 RNA polimerase sob controle de *lacUV5*. Resumidamente, a cepa hospedeira foi cultivada em um meio LB suplementado com 0,2% de maltose, 10 mM de $MgSO_4$, e antibióticos a 37°C, a uma DO_{600} de 0,5. Depois, 10^8 λDE3 pfu, 10^8 Fago "Helper" pfu, e 10^8 Fago de Seleção pfu foram incubados com 10 µl de células hospedeiras. A mistura hospedeiro/fago foi incubada a 37°C por 20 minutos para permitir ao fago ser adsorvido no hospedeiro. Finalmente, a mistura foi pipetada em placa LB suplementada com antibióticos. A mistura foi espalhada uniformemente utilizando contas de plaqueamento, e as placa foram placas invertidas e incubadas a 37°C durante a noite.

Candidatos λDE3 lisogênicos foram avaliados para suas habilidades de suportar o crescimento do Fago de Testagem T7. O Fago de Testagem T7 é um fago T7 mutante de deleção que é completamente defectivo salvo quando T7 RNA polimerase ativa é provida pela célula hospedeira. O Fago de Testagem T7 foram placas muito grandes em λDE3 lisogênicos autênticos na presença

de IPTG, enquanto placas bem menores são observadas na ausência do indutor. O tamanho relativo das placas na ausência de IPTG é uma indicação do nível de expressão basal da T7 RNA polimerase no lisógeno, e podem variar amplamente entre diferentes "backgrounds" de célula hospedeira.

O seguinte procedimento foi utilizado para determinar a presença de lisogenia de DE3. Primeiro, colônias candidatas foram cultivadas em meio LB suplementado com 0,2% de maltose, 10 mM de $MgSO_4$, e antibióticos a 37°C, a uma DO_{600} de 0,5. Uma alíquota do Fago de Testagem T7 foi então diluído em Tampão de Diluição de Fago 1X a uma titulação de 2×10^3 pfu/mL. Em tubos em duplicata, 100 µl de células hospedeiras foram misturadas com 100 µL de fago diluído. A mistura hospedeiro/fago foi incubada a temperatura ambiente por 10 minutos para permitir ao fago ser adsorvido no hospedeiro. Após, 3 mL de "top agarose" derretida foi adicionada em cada tubo contendo hospedeiro e fago. Os conteúdos de uma duplicata foram plaqueados em placa LB e a outra duplicata em uma placa LB suplementada com 0,4 mM de IPTG (isopropil-b-tiogalactopiranosídeo) para avaliar a indução da T7 RNA polimerase. Placas foram permitidas a repousar por 5 minutos até a solidificação da "top agarose". As placas foram então invertidas a 30°C durante a noite.

Construção de cepa MG1655(DE3, *ΔfadD, yjgB*::kan)

A cepa mutante nulo *yjgB*, MG1655(DE3, *ΔfadD*, *yjgB*::kan), foi construída utilizando o seguinte protocolo do sistema lambda red (*Datsenko et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:6640-6645, 2000):

O gene de resistência a canamicina do pKD13 foi amplificado com oligos yjgBRn: 5`-GCGCCTCAGATCAGCGCTGCGAATGATTTTCAAAAATCGGCTTTCAACACTGTAGGCTGGAG CTGCTTCG-3`(SEQ ID NO:53); e yjgBFn: 5`-CTGCCATGCTCTACACTTCCCAAACAACACCAGAGAAGGACCAAAAAATGATTCCGGGGATC CGTCGACC-3`(SEQ ID NO:54). Esse produto de PCR foi eletroporado em *E. coli* MG1655 (DE3, Δ*fadD*)/pKD46. As células foram plaqueadas em L-cloramfenicol (30 µg/mL) (L-Cm) e cultivados durante a noite a 37°C. Colônias individuais foram selecionadas e plaqueadas em outra placa L-Cm e cultivadas a 42°C. Essas colônias foram transferidas para placas L-Cm e L- carbenicilina (100 mg/mL) (L-Cb) e cultivadas a 37°C durante a noite. Colônias que eram Cm^R e Cb^S foram avaliadas adicionalmente através de PCR para garantir que o produto de PCR inseriu no sítio correto. Verificação de PCR foi desempenhado em lisados de colônias dessas bactérias utilizando oligos BF: 5`- GTGCTGGCGATACGACAAAACA-3`(SEQ ID NO:55); e BR: 5`-CCCCGCCCTGCCATGCTCTACAC-3`(SEQ ID NO:56). O tamanho esperado da deleção *yjgB*::kan foi de por volta de 1450 pb.

Avaliação de *FadD* em relação a produção de álcool graxo utilizando cepa MG1655 (DE3, *ΔfadD*)

No Exemplo 2, uma cepa de deleção *fadE* foi utilizada para produção de aldeído graxo e álcool graxo proveniente de 'TesA, homólogos de CAR, e álcool desidrogenase(s) endógenas em *E. coli*. Para demonstrar que homólogos de CAR utilizaram ácidos graxos ao invés de acil-CoA como um substrato, o gene codificando para acil-CoA sintase em *E. coli* (*fadD*) foi deletado de modo que ácidos graxos produzidos não forma ativados com CoA. *E. coli*

cepa MG1655 (DE3, *ΔfadD*) foi transformada com pETDuet-1-'TesA e pACYCDuet-1-*carB*. As transformantes foram avaliadas para produção de álcool graxo utilizando os métodos descritos aqui. Esses transformantes produziram por volta de 360 mg/L de alcoóis graxos (dodecanol, dodecenol, tetredecanol, tetredecenol, cetil, hexadecenol, e octadecenol).

YjgB é uma álcool desidrogenase. Para confirmar que YjgB foi uma álcool desidrogenase responsável para converter aldeídos graxos em seus alcoóis graxos correspondentes, pETDuet-1-'TesA e pACYCDuet-1-*fadD9* foram co-transformados em MG1655(DE3, *ΔfadD*) ou MG1655(DE3, *ΔfadD*, *yjgB*::kan). Ao mesmo tempo, MG1655(DE3, *ΔfadD*, *yjgB*::kan) foi transformada com pETDuet-1-'*tesA-yjgB* e pACYCDuet-1-*fadD9*.

As transformantes de *E. coli* foram cultivadas em 3 mL de um meio LB suplementado com carbenicilina (100 mg/L) e cloramfenicol (34 mg/L) a 37°C. Após crescimento durante a noite, 15 µL de cultura foi transferida em 2 mL de um meio LB fresco suplementado com carbenicilina e cloramfenicol. Após 3,5 hrs de crescimento, 2 mL de cultura foi transferido em um frasco de 125 mL contendo 20 mL de um meio M9 contendo glicose 2%, carbenicilina, e cloramfenicol. Quando a DO_{600} da cultura atingiu 0,9, 1 mM de IPTG foi adicionada a cada frasco. Após 20 horas de crescimento a 37°C, 20 mL de acetato de etila (com 1% de ácido acético, v/v) foi adicionada a cada frasco para extrair os alcoóis graxos produzidos durante a fermentação. O extrato bruto de acetato de etila foi diretamente analisado utilizando GC/MS como descrito aqui.

A cepa mutante nulo de *yjgB* resultou em acúmulo

significativo de dodecanal e uma titulação mais baixa de álcool graxo. A expressão de *yjgB* proveniente de pETDuet-1-'*tesA-yjgB* na cepa mutante nulo de *yjgB* efetivamente removeu o acúmulo de dodecanal. O dado indicou que YjgB foi envolvido em converter dodecanal em dodecanol e que pode haver outras álcool desidrogenase(s) presentes em *E. coli* para converter outros aldeídos em alcoóis. Dodecanal acumulou na cepa mutante nulo de *yjgB*, porém não foi observado tanto na cepa selvagem (MG1655(DE3, *ΔfadD*)) quanto na cepa mutante nulo de *yjgB* com o plasmídeo de expressão de *yjgB*.

EXEMPLO 31. GERAÇÃO DE BIBLIOTECA 'TesA

Nesse Exemplo, métodos são descritos para preparação de uma biblioteca mutante de 'TesA. Um vetor de expressão apropriado tal como pACYC-'TesA que codifica 'TesA, a TesA truncada faltando o peptídeo sinal, permite produção de uma proteína 'TesA na cepa hospedeira. O plasmídeo pACYC-'TesA inclui a sequência '*tesA* sob a regulação de um promotor trc, um terminador de transcrição, um origem de replicação *p15a*, uma fase aberta de leitura codificando *lacIq*, e o gene de resistência a antibiótico beta-lactamase.

A sequência de aminoácidos da proteína 'TesA é provida em SEQ ID NO:31.

O "kit" QuikChange Mutagenesis (Stratagene) permite a fácil construção de grande número de mutantes. A utilização desse "kit" para construir cada mutante 'TesA começa com dois oligos complementares contendo um ou mais bases não pareadas requeridos

para alterar o aminoácido codificado na posição desejada. Os oligos têm 25-45 nucleotídeos de comprimento, com temperatura de separação das fitas ≥78°C como calculado utilizando a fórmula:

$$T_m = 81,5 + 0,41(\%GC)\ 675/N$$

onde T_m é a temperatura de separação das fitas, %GC é o percentual de resíduos no oligo que são guanosina ou citidina, e N é o número de nucleotídeos no oligo. Por exemplo, os oligos:

CACGTTATTGATTCTGGGTAATAGCCTGAGCGCCGGGTATCG (SEQ ID NO:57)

e

CGATACCCGGCGCTCAGGCTATTACCCAGAATCAATAACGTG (SEQ ID NO:58)

onde utilizados para mutar o ácido aspártico no resíduo 9 para asparagina, onde as bases sublinhadas indicam o códon que foi alterado.

Os oligos foram utilizados em uma reação da polimerase em cadeia com pACYC-'TesA como molde, utilizando o seguinte programa de ciclagem de temperatura: 1 minuto a 95°C; seguido por 18 ciclos de 50 segundos a 95°C, 50 segundos a 60°C, e 5 minutos a 68°C; e 7 minutos a 68°C. Os produtos de reação foram então digeridos utilizando as enzimas de restrição DpnI, para seletivamente degradar o DNA molde metilado. O DNA restante foi então transformado em *E. coli* para isolar os clones plasmidiais, que foram então sequenciados para verificar que as substituições foram obtidas.

EXEMPLO 32. ENSAIOS

Nos seguintes Exemplos, ensaios para determinação de conteúdo de proteína, níveis de ácido graxo livre, e hidrólise de substratos acil-PNP e acil-CoA são descritos. Ensaios específicos utilizados aqui são também publicados abaixo.

Ensaios para Determinação de Conteúdo Protéico em Lisados Celulares

Lisados celulares de culturas de expressão de *E. coli* produzindo variantes 'TesA foram preparados para caracterização. Para gerar as culturas de expressão, culturas de semeadura foram crescidas durante a noite a 37°C em um meio LB contendo glicose 1% (w/v) e 100 µg/mL de carbenicilina. As culturas de semeadura foram então diluídas 1:100 no mesmo meio e crescidas por 3 horas a 37°C com agitação (200 rpm). Uma alíquota de 40 µL de cada cultura foi então adicionada a 360 µL de meio LS9-1 (descrito abaixo) suplementado com 100 µg/mL de carbenicilina e crescida em uma placa de 96 poços. Após 3 horas adicionais de crescimento, isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG, a uma concentração final de 1 mM) e Bis-Tris Propano (pH 7,0, a concentração final de 0,1 M) foram adicionados, e as culturas foram permitidas a crescer durante a noite.

Precipitados celulares foram coletados através de centrifugação das culturas de expressão (10 minutos a 3.500 rpm). O meio de crescimento é descartado e os precipitados celulares é armazenado a -80°C. Para preparar extratos solúveis, os precipitados celulares congelados são lisados em BugBuster (EMD Biosciences, Nº Cat. 70584-4) 50% em fosfato de sódio 25 mM, pH 7,0. Após 40 minutos de agitação, os lisados celulares são clarificados através de centrifugação (10 minutos a 3.500 rpm).

A concentração de proteína no sobrenadante dos lisados celulares é então medida utilizando o ensaio de ácido bicinconínico (BCA), de acordo com o protocolo provido pelo fabricante (Thermo Scientific, Nº Cat. 23225). O sobrenadante é então utilizado nos ensaios descritos abaixo.

Meio:

Solução de Sal		concentração final 1X
Na_2HPO_4	30 g	6 g/L
KH_2PO_4	15 g	3 g/L
NaCl	2,5 g	0,5 g/L
NH_4Cl	5 g	1 g/L
dH_2O	para 1 L	

soluções estoque:	concentração final:	
10 mg/mL de Tiamina (Vitamina B1)	1 mg/L	
$MgSO_4$ 1M	1 mM	
$CaCl_2$ 1M	0,1 mM	
Glicose 20%	2,00%	
Água estéril		
20 mg/mL de uracila	20 µg/mL	alto pH
Minerais-traço 1000x	1x	

Para 1 L de meio LS9-1 com 1,0 % de glicose:

200 mL de Solução de Sal 5x

100 µL de Tiamina (B1)

1 ml de $MgSO_4$

100 µL de $CaCl_2$

50 mL Glicose 20%

1 mL de minerais-traço

1 mL de Uracila

Água para 1L (pré-preparo em 750 mL)

Solução TM (esterilizado em filtro):

27 g/L de $FeCl_3$ - 6 H_2O

2 g/L de $ZnCl_2$ - $4H_2O$

2 g/L de $CaCl_2$ - $6H_2O$

2 g/L de Na_2MoO_4 - $2H_2O$

g/L de $CuSO_4$ - $5H_2O$

0.5 g/L de H_3BO_3

100 mL/L de HCl concentrado

q.s. c/ água Milli-Q

Análise de Ácido Graxo Livre

Variantes 'TesA são produzidas em culturas de expressão de *E. coli*, e os ácidos graxos livres produzidos pelas culturas foram analisados. Para gerar as culturas de expressão, culturas de semeadura foram primeiro crescidas durante a noite a 37°C em um meio LB contendo glicose 1% (w/v) e 100 µg/mL de carbenicilina, e então diluído 1:100 no mesmo meio e crescidas por 3 horas a 37°C com agitação (200 rpm). 40 µL de cada cultura foi então adicionada a 360 µL de meio LS9-1 suplementado com 100 µg/mL de carbenicilina e crescida em uma placa de 96 poços. Após 3 horas adicionais de crescimento, isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG, a uma concentração final de 1 mM) e Bis-Tris Propano (pH 7,0, a concentração final de 0,1 M) foram adicionados, e as culturas foram permitidas a crescer durante a noite.

As culturas foram então acidificadas com HCL 1N a um pH final de por volta de 2,5 e então extraídas com 600 µL de acetato de etila. Ácidos graxos livres na fase orgânica foram derivatizados com hidróxido de tetrametilamônia (TMAH) para gerar os respectivos metil ésteres, que foram então analisados em um cromatógrafo de gases equipado com um detector de ionização de chama.

Ensaio de Hidrólise de Acil-PNP Graxo

Nesse sistema de ensaio, as soluções de reagente utilizadas foram:

Triton X-100 2% em fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0

acil-para-nitrofenol (acil-PNP) 10 mM em acetona

Para preparar um solução de uso de acil-PNP, 600 µL de acil-PNP estoque foi adicionado a 9,4 mL de tampão fosfato e misturado bem.

O ensaio foi desempenhado através de adição de 40 µL de solução de uso de acil-PNP em cada poço de uma placa de 96 poços, seguido pela rápida adição de 40 µL de lisado celular clarificado. As soluções foram misturadas por 15 segundos, e a alteração de absorbância foi lida a 405 nm em um leitor de placa de microtitulação a 25°C. A atividade de esterase foi expressa como a proporção de $(\Delta A405/sec)_{mut}/(\Delta A405/sec)_{wt}$, caracterizado pelo fato de $(\Delta A405/sec)_{mut}$ ser a alteração de absorbância a 405 nm por segundo em amostras contendo 'TesA mutante, e $(\Delta A405/sec)_{wt}$ ser a alteração de absorbância a 405 nm por segundo em amostras contendo 'TesA selvagem.

Ensaio de Hidrólise de Acil-CoA

Nesse sistema de ensaio, as soluções de reagentes utilizadas foram:

acil-coenzima A (acil-CoA) 10 mM em fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0

fosfato de sódio 50 mM, pH 8,0, monobromobimano (MBB) (Novagen, Nº Cat. 596105) 50 mM em acetonitrila. Para preparar solução de uso de acil-CoA, 0,5 mL de acil-CoA estoque e 0,5 mL MBB estoque foram adicionados a 29 mL de tampão fosfato seguido por homogeneização.

O ensaio foi desempenhado através de adição de 60 µL de solução de uso de acil-CoA em cada poço de uma placa preta de 96 poços, seguido pela rápida adição de 40 µL de lisado celular clarificado. Após homogeneização por 15 segundos, o progresso da reação foi monitorado através de fluorescência (λ_{ex} = 380 nm, λ_{em} = 480 nm) em um leitor de placa de microtitulação a 25°C. A atividade de acil-CoA tioesterase foi expressa como a proporção de $(\Delta RFU/sec)_{mut}/(\Delta RFU/sec)_{wt}$, caracterizado pelo fato de $(\Delta RFU/sec)_{mut}$ ser a alteração de unidades de fluorescência relativa por segundo em amostras contendo 'TesA mutante, e $(\Delta RFU/sec)_{wt}$ ser a alteração de unidades de fluorescência relativa por segundo em amostras contendo 'TesA selvagem.

Aplicando a Metodologia de Pontuação Z

Uma determinação de pontuação Z foi conduzida seguindo a metodologia de pontuação Z como se segue.

A pontuação Z para uma amostra é definida como o número de desvios padrão que o sinal da amostra difere da média de sinal da população controle. A pontuação Z foi utilizada para ranquear os mutantes de acordo com as propriedades de interesse tais como, por exemplo, especificidade de comprimento de cadeia de substrato, preferência relativa para ligações éster sobre tioéster, preferência relativa para ligações tioéster sobre éster, e a proporção ou porcentagem de éster produzido. A pontuação Z é medida utilizando o seguinte cálculo:

Z= (valor da amostra - média do controle)/Desvio padrão dos controles

O controle positivo utilizado para gerar a biblioteca de 'TesA mutante aqui foi 'TesA selvagem.

Em uma distribuição normal, por volta de 2,1% dos dados irão conter 2 ou mais desvios padrão acima da média, e por volta de 0,1% dos dados irão conter 3 ou mais desvios padrão acima da média. Portanto, pontuações Z de 2 ou mais, 3 ou mais, -2 ou menos, -3 ou menos e assim por diante são utilizados para definir classe cada vez mais estringentes de dados que não são prováveis de ocorrer ao acaso.

Aquelas variantes que apresentam uma pontuação Z maior que 3 foram marcadas como apresentando um desempenho melhorado em termos de preferência para substratos de certos comprimentos de cadeia e/ou taxa catalítica. Além disso, aquelas variantes que apresentam uma pontuação Z maior que 3 foram marcadas, sob outras circunstâncias, como provendo uma produtividade proporcional ou de porcentagem melhorada ou aumentada para ésteres graxos X ácidos graxos livres. Adicionalmente, aquelas variantes que apresentam uma pontuação Z de -3 ou menos foram marcadas, em ainda outras circunstâncias, como provendo uma produtividade proporcional ou de porcentagem reduzida para ésteres graxos X ácidos graxos livres.

Números de especificidade de substrato são definidos com a curva cinética de um dado mutante para um substrato, dividido pelo total de curvas cinéticas para os três substratos estudados no ensaio PNP (C_{10}, C_{12}, C_{14}), onde a curva cinética é a taxa inicial observada para a hidrólise de um dado substrato de éster.

Por exemplo, para calcular um número de especificidade de

substrato para C_{10}:

C_{10} EspecSubs = Curva do Mutante C_{10} /(Curva do Mutante C_{10} + C_{12} + C_{14})

Após, a pontuação Z de especificidade de substrato foi calculada. A Média e Desvios Padrão dos números de especificidade de substrato para os controles positivos foram primeiro calculados (para cada placa), e a seguinte fórmula foi aplicada:

Pontuação Z EspecSub C_{10} Mutante = (EspecSub C_{10} Mutante – MédiaEspecSub)/DPEspecSub

Como outro exemplo, para calcular um número de especificidade de éster:

EspecÉster = Curva Mutante C_{14}-PNP / Curva Mutante C_{14}-CoA

Depois, uma pontuação Z de especificidade de éster foi calculada. A Média e Desvios Padrão dos números de especificidade de éster para os controles positivos foram primeiro calculados (para cada placa), e a seguinte fórmula foi aplicada:

Pontuação Z de Especificidade de Éster Mutante = (EspecÉster Mutante – MédiaEspecÉster)/DPEspecÉster

Aquelas variantes que apresentam uma pontuação Z de Especificidade de Éster maior que 3 foram definidas e marcadas como apresentando uma preferência para éster sobre tioéster, e/ou como apresentando atividade melhorada (*i.e.*, taxa catalítica) no que diz respeito a éster sobre tioéster. Aquelas variantes que apresentam uma pontuação Z de Especificidade de

Éster menor que -3 foram marcadas como apresentando uma preferência por tioéster sobre éster.

EXEMPLO 33. ANÁLISE DE ÁCIDO GRAXO LIVRE DE VARIANTES DE 'TesA

Nesse Exemplo, resultados de ensaios identificando várias propriedades de variantes de 'TesA são providos. A análise foi conduzida utilizando os métodos descritos acima no Exemplo 32. Nas tabelas das **FIGs. 45** e **46**, as mutações são apresentadas utilizando "Códigos Variantes", cada um do qual provê o aminoácido selvagem, seguido pela posição na sequência de aminoácido, seguido pelo aminoácido de substituição (*ex.*, "S10A" indica que a serina na posição 10 na sequência de aminoácido foi substituída pela alanina nessa variante particular).

EXEMPLO 34. ANÁLISE DE VARIANTES DE 'TesA

Resultados de ensaio para variantes de 'TesA são providas nos **anexos 4-10.** A análise foi conduzida utilizando os métodos descritos acima no Exemplo 32. Como mostrado nos **anexos 4 e 5,** níveis de atividade em substratos C_{10}, C_{12} e C_{14} e especificidade de substrato foram analisados.

Os anexos 4 e 5 representam índices de desempenho de certas variantes de 'TesA da biblioteca de 'TesA mutante, que demonstra desempenho melhorado comparado com a enzima selvagem. Os anexos 4 e 5 representam índices de desempenho de mutantes 'TesA em termos de especificidade para substratos de certos comprimentos de cadeia.

ANEXO 6 representa mutantes 'TesA que proveram

produtividade proporcional ou de porcentagem aumentada ou melhorada de ésteres graxos X ácidos graxos livres. **ANEXO 7** representa mutantes 'TesA que proveram produtividade proporcional ou de porcentagem reduzida de ésteres graxos X ácidos graxos livres. Somente mutantes que apresentaram pontuações Z acima de 3 são ilustradas na tabela e outros mutantes apresentando atividades menores não estão incluídos. Apesar da apresentação de dados, é submetido que uma pontuação Z mais baixa pode identificar mutantes valorosos e a ponto de corte da pontuação Z de 3 provido nos **ANEXOS 4 E 5** não tem como intuito limitar o escopo da invenção.

Os resultados são representados graficamente juntamente com o comprimento inteiro da molécula 'TesA nas **Figs. 33A-C.**

Atividade de Produção de Ácido Graxo para Variantes de 'TesA

Resultados de ensaio para atividade de produção de ácido graxo nas variantes 'TesA são conduzidos utilizando os métodos descritos acima no Exemplo 32.

Ensaio de Acil-PNP Graxo de Variantes de 'TesA

Resultados de ensaio para atividade de acil-PNP graxo de variantes de 'TesA são providos nos **ANEXOS 4 E 5.** A análise foi conduzida utilizando os métodos descritos acima no Exemplo 32.

Análise de Acil-CoA de Variantes 'TesA

Resultados de ensaio para atividade de acil-CoA de variantes de 'TesA são providos nos **ANEXOS 4 E 5.** A análise foi conduzida utilizando os métodos descritos acima no Exemplo 32.

Preferência por Tioéster (Acil-CoA) sobre Éster (Acil-PNP)

Resultados de ensaio para atividade de acil-CoA e atividade de acil-PNP de variantes de 'TesA são conduzidos utilizando os métodos descritos acima no Exemplo 32.

Preferência por Éster (Acil-PNP) sobre Tioéster (Acil-CoA)

Resultados de ensaio para atividade de acil-CoA e atividade de acil-PNP de variantes de 'TesA são conduzidos utilizando os métodos descritos acima no Exemplo 32.

EXEMPLO 35. PRODUÇÃO DIRETA DE ÉSTERES GRAXOS NA AUSÊNCIA DE ÉSTER SINTASE

Nesse exemplo, a habilidade de 'TesA para catalisar a transesterificação de um acil-CoA graxo no éster graxo correspondente na presença de um álcool *in vitro* é demonstrado. Enzima 'TesA de *E.coli* foi expressa recombinantemente e purificada a homogeneidade como uma proteína com 6X His-tag N-terminal. Em particular, o gene '*TesA* codificando a enzima tioesterase I proveniente de *E.coli* (SEQ ID NO:31) foi inserido em um vetor pET15-b (Novagen), cujo vetor carregava um 6X His-tag N-terminal , e transformado em células BL21-DE3 para expressão. Células foram cultivadas em meio LB a 37°C, 200 rpm, até atingir DO_{600} de 1,0, induzidas com IPTG 0,5 mM (final), e então permitidas a crescer a 28°C por 5 horas adicionais. Após coletado a 6.000 rpm, o precipitado foi ressuspendido em 40mL de Tris-HCl 100mM, pH 7,4, sonicado e centrifugado a 10.000 rpm por 20 minutos. Lisado clarificado foi então aplicado a uma coluna His-bind (Calbiochem) e a proteína foi purificada de acordo com

as instruções do fabricante. Proteína eluída foi então dialisada em um tampão contendo fosfato de sódio 25mM, pH 7,2, e glicerol para armazenamento e uso. A atividade de tioesterase da enzima 'TesA purificada foi determinada.

Catálise de acil-CoA graxo em éster graxo por 'TesA envolve um ataque nucleofílico através de um álcool no centro carbonil subsequente à saída da porção de coenzima A do sítio ativo. A taxa de transesterificação espontânea de ácido palmítico por etanol na ausência de 'TesA foi analisado para provar que etanol pode substituir água como o nucleófilo para formar ésteres graxos ao invés de ácidos graxos.

De acordo, uma alíquota de 4 mM (por volta de 1 mg/mL) de ácido palmítico (C_{16}-COOH) (Sigma) foi incubada com quantidades variáveis de etanol por diferentes períodos de tempo a temperatura ambiente. Amostras foram extraídas com proporção volumétrica 1:1 de acetato de etila e o extrato foi analisado utilizando GC-MS para a presença de etil palmitato. Os resultados estão compilados na Tabela 23 abaixo, que indicou que transesterificação espontânea entre etanol e ácido palmítico ocorre a uma taxa de conversão de menos que 0,01 mole/mole de ácido palmítico.

Tabela 23

% Etanol (v/v)	C_2C_{16} formado*, mg/L	% conversão (g/g)	% conversão (mole/mole)
0	0	0	0
20	0,34	0,034	0,030
30	0,25	0,025	0,022
40	0,25	0,025	0,022
50	0,35	0,035	0,031

*: Média de dois pontos de dados.

A taxa de transesterificação *in vitro* catalisada por 'TesA em substrato palmitoil-CoA foi analisada. Reações foram conduzidas a temperatura ambiente por 1 hora em um tampão contendo 100 µM de palmitoil-CoA, 100 µM de tampão Fosfato pH 7,0 e BSA 1mM, tanto na presença quanto na ausência de 1,5 µM de 'TesA purificada. Concentrações de etanol variaram entre 0-60% (v/v). Proporção volumétrica de 1:1 acetato de etila foi utilizada para esmorecimento e subsequente extração. Formação de etil palmitato foi monitorada utilizando GC-MS. Tabela 24 resume os resultados.

Tabela 24

Etanol	Etil palmitato (mg/L)		Etil palmitato formado	% conversão	% conversão
% v/v	- 'TesA	+ 'TesA	(mg/L)	(g/g de C16-CoA)	(mole/mole)
0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0
10	0	4,12	4,12	4,12	14,57
20	0	6,64	6,64	6,64	23,49
40	0	1,88	1,88	1,88	6,65
60	0	1,74	1,74	1,74	6,15

Os resultados indicam que tioesterase 'TesA eficientemente catalisa a transesterificação de um acil-CoA, palmitoil-CoA, em etil palmitato na presença de etanol. Produtividade máxima obtida foi 23,5 mole/mole de palmitoil-CoA. Dado que produtividades para conversão espontânea de ácido palmítico em éster palmítico são extremamente baixas comparadas àquelas na presença de 'TesA (*i.e.*, indicando um aumento > 1.000 vezes) a conversão ocorre enzimaticamente. Baseado em nossos dados, produtividade máximas de transesterificação ocorreram a níveis de etanol 10-20% (v/v). Concentrações mais altas de álcool

afetam a estabilidade de enzima e/ou atividade adversamente e, portanto, resultam em produtividades menores de éster.

Desse resultados, uma conclusão foi atingida que a tioesterase pode catalisar a esterificação direta de um substrato acil-CoA na presença de álcool. Será possível modificar o produto de éster através da mudança do álcool (*ex.*, utilizando metanol, propanol ou butanol) e/ou a concentração de álcool.

EXEMPLO 36. PRODUÇÃO *IN VIVO* DE ÉSTERES GRAXOS PELA TIOESTERASE

Nesse exemplo, a habilidade de 'TesA produzir ésteres *in vivo* na ausência de éster sintase expressa de maneira heteróloga foi investigada. A formação de éster na ausência de uma éster sintase expressa de maneira heteróloga foi observada na *E. coli* cepa MG1655 (Δ*fadE*), que também carrega um operon artificial contendo '*tesA* e *fadD* sob o controle de um promotor *trc*, juntamente com um gene marcador de canamicina. O operon foi integrado no cromossomo, interrompendo o gene *lacZ* nativo. Essa cepa foi testada em uma fermentação em frasco de agitação utilizando meio contendo 6 g/L de Na_2HPO_4, 3 g/L de KH_2PO_4, 0,5 g/L de NaCl, 1 g/L de NH_4Cl, 1 mg/L de tiamina, 1 mM de $MgSO_4$, 0,1 mM de CaCl, suplementado com NH_4Cl extra (1 g/L adicional), tampão Bis-Tris (0,2 M), Triton X-100 (0,1% v/v), e minerais-traço (27 mg/L de $FeCl_3$-6 H_2O, 2 mg/L de $ZnCl_2$ - $4H_2O$, 2 mg/L de $CaCl_2$ - $6H_2O$, 2 mg/L de Na_2MoO_4 - $2H_2O$, 1,9 mg/L de $CuSO_4$ - $5H_2O$, 0,5 mg/L de H_3BO_3, 100 mL/L de HCl concentrado).

Uma cultura pré-semeadura de LB + antibióticos foi inoculada com uma raspa de um estoque de glicerol ou a partir de uma

colônia isolada. Ela foi cultivada por 6 a 8 horas até atingir uma DO_{600} > 1,0. Uma cultura de semeadura crescida durante a noite contendo meio de fermentação mais glicose 2% (w/v) + antibióticos foi inoculada com a o LB de cultura pré-semeadura a 4% (v/v). 15 mL de culturas de produção contendo meio de fermentação + glicose 3% (w/v) + antibióticos foram preparadas em frascos do tipo balão de agitação de 125 mL. Uma quantidade apropriada da cultura de semeadura durante a noite foi utilizada para inocular a cultura de produção de modo que a DO_{600} inicial era de por volta de 0,5. Os frascos foram permitidos a crescer até a DO_{600} neles atingirem 1,0, o ponto no qual as culturas foram induzidas com IPTG 1mM (concentração final) e alimentadas com metanol ou etanol (a 2% v/v). As corridas de fermentação foram permitidas a continuar para a quantidade de tempo indicada pós-indução. Todas as etapas de cultura foram desempenhados a 32°C com agitação a 200 rpm.

Extrações de caldo bruto foram desempenhadas utilizando um procedimento de micro-extração padrão. Brevemente, 500 µl de caldo foi transferido para um tubo de micro-centrífuga, ao qual 100 µl de HCl 1M foi adicionado. As culturas acidificadas foram extraídas com 500 µl de acetato de etila, submetidos ao vórtex por 5 minutos, e centrifugada a velocidade máxima por 1 minuto. A camada orgânica foi analisada utilizando GC-FID para tanto quantificação simultânea de metil éster de ácido graxo (FAME) e ácido graxo livre (FFA) quanto quantificação simultânea de etil éster de ácido graxo (FAEE) e FFA.

Em amostras contendo FAEE e FFA, os FFA foram derivatizados com Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida antes da quantificação.

A cepa MG1655 (Δ*fadE*) pTrc-'TesA_*fadD*, que foi cultivada e alimentada com metanol 2% na indução, produziu 2 g/L de FAMEs totais no ponto de tempo de 24 horas e 3,5 g/L de FAMEs totais ao final da fermentação a 48 horas (**FIG. 26**). Quantidades mínimas de FFAs foram detectadas, por volta de 100 mg/L no total. As culturas atingiram sua densidade mais alta, DO_{600} por volta de 11, após 24 horas e não continuou a crescer nas próximas 24 horas. A produtividade específica foi calculada para ser por volta de 200 mg/L/DO a 24 horas, e por volta de 300 mg/L/DO a 48 horas. Esses dados indicam que, com a super-expressão de *'tesA* e *fadD*, mesmo na ausência de uma sintase de cera, a produção de FAME foi observada.

Para avaliar a habilidade de FadD ou 'TesA de independentemente produzir FAME, uma segunda fermentação foi conduzida testando duas cepas diferentes de *E. coli* carregando plasmídeos com *fadD* ou *'tesA*, ou com ambos *fadD* e *'tesA*. Os plasmídeos eram todos baseados em pACYC e a expressão era direcionada por um promotor trc. Três cepas diferentes de MG1655 (Δ*fadE*) foram testadas, uma com somente um plasmídeo *fadD*, uma com somente um plasmídeo *'tesA*, e uma com *'tesA* e *fadD* com *'tesA* estando localizado a montante de *fadD*. Duas C41 (Δ*fadE*) foram testadas, ambas carregando *'tesA* e *fadD*, porém com genes em ordem diferente relativa ao promotor. Essas cepas foram cultivadas no meio descrito acima e alimentadas com metanol 2% na indução e crescidas por 25 horas adicionais pós-indução. A cepa expressando somente *fadD* não produziu quaisquer FAMEs enquanto a cepa *'tesA* produziu somente por volta de 150 mg/L de FAMEs (**FIG. 27**). A presença de ambos 'TesA e *fadD* apresenta melhora na produção de FAME comparado com 'TesA sozinho. As duas cepas C41

produziram um aumento adicional na produção de FAME, como observado na cepa carregando um plasmídeo no qual *fadD* está a montante de *'tesA*, comparado com a cepa expressando *'tesA* e *fadD* na ordem oposta. Isso sugere que expressão mais alta de FadD aumentou a habilidade de 'TesA de produzir ésteres. Já que 'TesA pode clivar tanto acil-ACPs quanto acil-CoAs, é provável que a produção de acil-CoAs por FadD está permitindo aos FFAs gerados por 'TesA a serem reciclados de volta à tioesterase para ou serem convertidos de volta nos FFAs através de hidrólise ou até se tornarem FAMEs através de alcólise. Examinação das titulações de FFA leva à conclusão de que somente a cepa expressando 'TesA produziu quantidades significativas de FFA, enquanto as cepas expressando *fadD* produziram muito pouco FFA (**FIG. 28**).

'TesA foi testada para sua habilidade de utilizar etanol para a formação direta de etil éster de ácido graxo (FAEE). As duas cepas MG1655 (Δ*fadE*) do experimento descrito acima, a cepa de super-expressão de *fadD* e a cepa de super-expressão de 'TesA, foram testadas. Também incluído nesse experimento foi a MG1655 (Δ*fadE*) com o operon *'tesA_fadD* integrado sob o controle de um promotor trc. Todas as cepas foram cultivadas utilizando o protocolo descrito acima. Na indução, todas as cepas foram alimentadas com 2% (v/v) de metanol ou 2% (v/v) de etanol. Em adição, a cepa MG1655 (Δ*fadE*) + *fadD* foi alimentada com 0,05% (w/v) de ácido graxo C14:0 para garantir que substrato de ácido graxo livre suficiente estava disponível para FadD catalisar a reação de alcólise potencial. As fermentações foram permitidas a continuar por 24 horas.

Sob essas condições de fermentação, FadD sozinho não foi

novamente capaz de produzir o FAME C_1C_{14}:0 ou FAEE C_2C_{14}:0 requisito, indicando que FadD não foi suficiente para formação de éster (**FIG. 29**). Porém, 'TesA sozinho foi capaz de produzir FAEEs e como antes, super-expressão de *'tesA* e *fadD* estimula produção geral de FAEEs sobre tendo *'tesA* sozinho. Enquanto as titulações gerais de FAEE foram menores que as titulações de FAME, esse dado demonstra que 'TesA pode também utilizar etanol em adição ao metanol para a formação de ésteres graxos. Análise de formação de FFA sob essas condições de fermentação indica que as cepas se comportaram similarmente com alimentação com etanol como com a alimentação com metanol (**FIG. 30**).

O FFA presente nas amostras fadD foi contribuído quase que integralmente pelo FFA C_{14}:0 alimentado durante a fermentação. A cepa expressando *'tesA* produziu uma grande quantidade de FFA, enquanto a cepa expressando *'tesA* e *fadD* apresentou muito pouco acúmulo de FFA. Na presença de 'TesA, somente 14% de conversão de FFA em FAME ou 2,3% de FFA em FAEE foi observada. Na presença de 'TesA e FadD, uma conversão de quase 100% de FFA em ou FAME ou FAEE foi observada. Esses dados sugerem que 'TesA é necessário e suficiente para formação de álcool éster de ácido graxo, porém a super-expressão de FadD juntamente com 'TesA é importante para formação de FAME e FAEE aumentada.

Os resultados prévios sugerem que 'TesA de *E. coli* pode produzir FAME e FAEE quando alimentada com os alcoóis apropriados durante a fermentação. Para determinar quando essa é uma função única a 'TesA de *E. coli,* a habilidade de outras tioesterases expressas de maneira heteróloga de produzir FAMEs foi investigada. Homólogos de 'TesA provenientes de *Photorhabdus*

luminescens e *Vibrio harveyi* juntamente com uma TesB proveniente de *Photobacterium profundum* foram super-expressas a partir de plasmídeos baseados em pACYC na cepa MG1655 (Δ*fadE*) e testados juntamente com a cepa de *E. coli* com super-expressão 'TesA provenientes das fermentações prévias. Fermentações em frasco de agitação foram conduzidas em meio de fermentação e permitidas a continuar por 24 horas após-indução. Os resultados indicaram que os dois homólogos 'TesA foram também capazes de gerar FAMEs (**FIG. 31**). 'TesA de *P. luminescens* produziram FAME a um nível comparável a 'TesA de *E. coli*, enquanto a 'TesA de *V. harveyi* foi capaz de produzir muito mais FAME que 'TesA de *E. coli*. Quando olhando as titulações de FFA, a 'TesA de *P. luminescens* produziu menos FFA que a 'TesA de *E. coli*, porém novamente, a 'TesA de *V. harveyi* produziu titulações muito maiores de FFA quando comparado com sua contraparte de *E. coli* (**FIG. 32**). Interessantemente, a 'TesA de *V. harveyi* foi altamente ativa e foi capaz de produzir titulações mais altas de FAME e FFA que a cepa controle expressando 'TesA de *E. coli*; além disso, sua taxa de conversão de FFA em FAME foi acima de 30% em comparação com os 14% de 'TesA de *E. coli*. Adicionalmente, apesar de produzir titulações de FAME total mais baixas, a cepa expressando 'TesA de *P. luminescens* mostrou que FAME constituiu mais de 60% da titulação total FAME + FFA.

Atividade de Éster Sintase em Outros Homólogos de 'TesA

Os homólogos de 'TesA provenientes de *Escherichia coli*, *Pectobacterium atrosepticum*, *Photobacterium profundum*, *Photorhabdus luminescens*, *Pseudomonas putida*, e *Vibrio harveyi* foram clonados no vetor de expressão pACYC sob o controle de um

promotor trc. Todas as sequências foram clonadas como genes truncados sem o peptídeo sinal, com o intuito de obter expressão citoplasmática. Sequências de DNA e aminoácidos para os homólogos são mostrados na Tabela 26. Um alinhamento das sequências de aminoácidos é mostrado na Tabela 27.

Os plasmídeos foram transformados em *E. coli* MG1655 Δ*fadE* e cultivado durante a noite a 37°C em placas de ágar LB contendo 100 µg/mL de carbenicilina. Colônias individuais foram selecionados e cultivados a 37°C e, um caldo LB contendo glicose 1% (w/v) e 100 µg/mL de carbenicilina até DO_{600} ter atingido um valor de por volta de 1,0. 200 µL da cultura foi então diluída em 1,8 mL de um meio M9 contendo 100 µg/mL de carbenicilina. Após crescimento das culturas por 3 horas a 37°C, IPTG (concentração final de 1 mM), assim como tampão Bis-Tris Propano (0,1 M, pH 7,0), e metanol (2% v/v) foram adicionados.

Após 20 horas de crescimento a 37°C, 1 mL de cultura foi extraído através de adição de 100 µL de HCl 1 N e 250 µL de acetato de etila. Um padrão interno de ácido graxo livre C20 foi incluído na solução de acetato de etila.

Os ácidos graxos e metil ésteres foram analisados em um cromatógrafo de gases Trace GC Ultra (Thermo Electron Corp) equipado com um detector de ionização de chama. A quantidade total de ácido graxo (FFA) e metil éster de acil graxo (FAME) produzido variou dentre os homólogos estudados (*veja* **FIG. 34**).

'TesA de *E. coli* produziu por volta de 300 mg/L nos produtos graxos totais, enquanto o homólogo de *Pseudomonas putida* gerou quase 4 vezes aquela quantidade. A proporção de FAME produzido

foi também dependente de qual homólogo de 'TesA foi expresso. Enquanto somente 3% do produto total gerado por 'TesA proveniente de *Pseudomonas putida* foi FAME, mais de 25% do produto total gerado pela 'TesA de *Vibrio harveyi* foi FAME. Esses resultados indicam que formação de éster é catalisado e influenciado pela 'TesA, ao invés de ser um processo puramente químico que não é afetado pela enzima. Além disso, essa atividade é uma função da sequência de aminoácido da enzima e que ela pode ser engenheirada para aumentar ou diminuir a propensão para produção de éster.

Para determinar quando a super-expressão de FadD iria aumentar titulações de FAME, os plasmídeos foram então transformados em *E. coli* MG1655 Δ*fadE* carregando o gene *fadD* no plasmídeo pCL1920, sob o controle de um promotor trc. As células transformadas foram cultivadas durante a noite a 37°C em placas de ágar LB contendo 100 µg/mL de carbenicilina e 100 µg/mL de espectinomicina. Colônias individuais foram selecionadas e cultivadas a 37°C em caldo LB contendo glicose 1% (w/v), 100 µg/mL de carbenicilina, e 100 µg/mL de espectinomicina até DO_{600} ter atingido um valor de por volta de 1,0. 200 µL da cultura foi então diluída em 1,8 ml de um meio M9 contendo 100 µg/mL de carbenicilina e 100 µg/mL de espectinomicina. Após crescimento das culturas por 3 horas a 37°C, IPTG (concentração final de 1 mM), assim como tampão Bis-Tris Propano (0,1 M, pH 7,0) e metanol (2% v/v) foram adicionados.

Após 20 horas de crescimento a 37°C, 1 ml de cultura foi extraída através de adição de 100 µL de HCl 1 N e 250 µL de acetato de etila. Um padrão interno de ácido graxo livre C_{20} foi incluído na solução de acetato de etila.

Os ácidos graxos e metil ésteres foram analisados em um cromatógrafo Trace GC Ultra (Thermo Electron Corp) equipado com um detector de ionização de chama. Como observado previamente com ‘TesA de *E. coli*, co-expressão de FadD aumentou a proporção de FAME produzido para todos os homólogos testados (*Veja* FIG. 35). Portanto, co-expressão de um acil-CoA sintase em conjunção com homólogos de ‘TesA pode ser utilizada para aumentar a produção de éster. Interessantemente, a titulação total de FFA mais FAME produzido pela ‘TesA proveniente de *P. putida* foi muito menor quando FadD foi co-expressa. Isso sugere que ‘TesA de *P. putida* pode ser mais específica para substratos acil-ACP que acil-CoAs, e pode ser co-expressa com uma éster sintase ou outra tioesterase com maior atividade contra acil-CoAs para aumentar adicionalmente a produção de éster.

Síntese de Éster Aumentada por uma Mutante ‘TesA

Como mencionado acima, os estudos de homólogos de ‘TesA indicaram que a atividade de éster sintase em ‘TesA em um traço capaz de ser engenheirado; ou seja, que pode sofrer alterações na sequência de aminoácidos da enzima para melhorar a produção de ésteres. Para esse fim, um mutante de ‘TesA de *E. coli* foi construído com atividade de éster sintase aumentada. Substituindo Ser10, o resíduo de serina nucleofílico no sítio ativo de ‘TesA, com cisteína para gerar o mutante S10C leva a uma enzima ‘TesA melhorada que produz um proporção maior de FAME.

Plasmídeos codificando ‘TesA selvagem de *E. coli*, o mutante S10C, ou nenhuma ‘TesA foram transformadas em *E. coli* MG1655 Δ*fadE* e cultivadas durante a noite a 37°C em placas de ágar LB contendo 100 µg/mL de carbenicilina. Colônias individuais foram

selecionadas e cultivadas a 37°C em caldo LB contendo glicose 1% (w/v) e 100 µg/mL de carbenicilina. As culturas foram então diluídas 1:100 em um meio LB fresco suplementado com glicose 1% (w/v) e 100 µg/mL de carbenicilina, e cultivados a 37°C até DO_{600} ter atingido um valor de por volta de 1,0. 200 µL da cultura foi então diluída em 1,8 ml de um meio M9 contendo 100 µg/mL de carbenicilina. Após crescimento das culturas por 3 horas a 37°C, IPTG (concentração final de 1 mM), assim como tampão Bis-Tris Propano (0,1 M, pH 7,0) e metanol (2% v/v) foram adicionados.

Após 20 horas de crescimento a 37°C, 1 mL de cultura foi extraído através de adição de 100 µL de HCl 1 N e 250 µL de acetato de etila. Um padrão interno de ácido graxo livre C_{20} foi incluído na solução de acetato de etila.

Os ácidos graxos e metil ésteres foram analisados em um cromatógrafo a gás Trace GC Ultra (Thermo Electron Corp) equipado com um detector de ionização de chama. A quantidade total de ácido graxo (FFA) e metil éster de acil graxo (FAME) foi maior em culturas de 'TesA selvagem de *E. coli* (316 mg/L) comparado ao mutante S10C (136 mg/L), porém a proporção de FAME em S10C (47%) foi maior que aquela observada com a 'TesA selvagem (9%). Isso demonstra que a sequência de 'TesA pode ser modificada para afetar a proporção de ésteres produzidos (*Veja* **FIG. 36**).

Tabela 26: Sequências de homólogos de 'TesA estudados no Exemplo 36

Espécie	Sequência de DNA	Sequência de Aminoácido
Escherichia coli	ATGGCGGACACGTTATTGATTCTGGGTG ATAGCCTGAGCGCCGGGTATCGAATGTC TGCCAGCGCGGCCTGGCCTGCCTTGTTG	MADTLLILGDSLSAGYRMSASAAWP ALLNDKWQSKTSVVNASISGDTSQQ GLARLPALLKQHQPRWVLVELGGND

	AATGATAAGTGGCAGAGTAAAACGTCGG TAGTTAATGCCAGCATCAGCGGCGACAC CTCGCAACAAGGACTGGCGCGCCTTCCG GCTCTGCTGAAACAGCATCAGCCGCGTT GGGTGCTGGTTGAACTGGGCGGCAATGA CGGTTTGCGTGGTTTTCAGCCACAGCAA ACCGAGCAAACGCTGCGCCAGATTTTGC AGGATGTCAAAGCCGCCAACGCTGAACC ATTGTTAATGCAAATACGTCTGCCTGCA AACTATGGTCGCCGTTATAATGAAGCCT TTAGCGCCATTTACCCCAAACTCGCCAA AGAGTTTGATGTTCCGCTGCTGCCCTTT TTTATGGAAGAGGTCTACCTCAAGCCAC AATGGATGCAGGATGACGGTATTCATCC CAACCGCGACGCCCAGCCGTTTATTGCC GACTGGATGGCGAAGCAGTTGCAGCCTT TAGTAAATCATGACTCATAA (SEQ ID NO:32)	GLRGFQPQQTEQTLRQILQDVKAAN AEPLLMQIRLPANYGRRYNEAFSAI YPKLAKEFDVPLLPFFMEEVYLKPQ WMQDDGIHPNRDAQPFIADWMAKQL QPLVNHDS (SEQ ID NO:31)
Pectobacterium atrosepticum	ATGGCTGATACATTATTAATTCTGGGTG ATAGCCTCAGTGCGGGCTACCAGATGCC GGCCGCTAACGCCTGGCCAACGCTGCTG AACACGCAGTGGCAGACGCAGAAAAAGG GCATCGCCGTGGTTAACGCCAGCATTAG CGGCGACACCACCGCACAGGGGCTGGCG CGACTTCCTGCCTTACTGAAACAACATC AGCCGCGTTGGGTGTTGATTGAACTGGG CGGCAATGACGGGCTTCGGGGGTTTCCG GCACCCAATATCGAGCAGGATCTGGCGA AAATCATTACGCTAGTCAAACAGGCTAA	MADTLLILGDSLSAGYQMPAANAWP TLLNTQWQTQKKGIAVVNASISGDT TAQGLARLPALLKQHQPRWVLIELG GNDGLRGFPAPNIEQDLAKIITLVK QANAKPLLMQVRLPTNYGRRYTESF SNIYPKLAEQFALPLLPFFMEQVYL KPEWIMEDGIHPTRDAQPFIAEWMA KQLEPLVNHES (SEQ ID NO:59)

	CGCTAAGCCTCTGCTGATGCAGGTTCGT TTGCCAACCAACTATGGCCGCCGCTACA CCGAGTCATTCAGCAACATTTACCCCAA ACTCGCGGAGCAGTTTGCGCTTCCTCTG CTGCCTTTCTTTATGGAGCAGGTGTATC TTAAACCGGAGTGGATCATGGAAGATGG CATCCATCCAACCCGTGATGCCCAACCG TTTATCGCAGAATGGATGGCGAAGCAGC TGGAACCCTTAGTTAACCATGAGTCTTA A (SEQ ID NO:60)	
Photobacterium profundum	ATGGGCAACACATTACTGGTTGTCGGTG ATAGCTTGAGCGCGGGCTATCAAATGCG GGCAGAACAAAGCTGGCCGGTGTTACTG CAACCCGCATTAAAGCAACAAGGTCACG AAATCACCGTTGTAAATGCCAGTATTTC AGGCGATACAACAGGAAACGGCTTGGCT CGATTGCCTACATTATTACAACAACATA AACCAGCTTACGTCATAATTGAACTCGG GGCGAATGATGGCTTACGTGGTTTCCCT CAAGGTACTATACGTAACAATCTCAGCC AAATGATCACTGAAATTCAAAATGCTGA TGCCAAGCCAATGCTCGTGCAGATAAAA GTGCCGCCCAATTACGGCAAACGCTACA GTGATATGTTCAGTTCTATTTACCCTCA ACTCAGTAAAGAGTTAGCCACACCACTG TTACCTTTCTTTTTAGAGCAGATCATTT TAAAACAAGAATGGATGATGAATGACGG TTTGCATCCTAAATCTGATGCTCAGCCA TGGATTGCCGAATATATGGCTGAGAATA	MAWGNTLLVVGDSLSAGYQMRAEQS WPVLLQPALKQQGHEITVVNASISG DTTGNGLARLPTLLQQHKPAYVIIE LGANDGLRGFPQGTIRNNLSQMITE IQNADAKPMLVQIKVPPNYGKRYSD MFSSIYPQLSKELATPLLPFFLEQI ILKQEWMMNDGLHPKSDAQPWIAEY MAENIAPYL (SEQ ID NO:61)

	TCGCGCCTTATTTATAA (SEQ ID NO:62)	
Photorhabdus luminescens	ATGGCTGATACCCTTCTGATTCTCGGTG ATAGCCTTAGTGCCGGTTACCATCTGCC TATTGAGCAGTCATGGCCTGCTTTGATG GAAAAAAAGTGGCAAAAATCCGGCAATA AAATCACGGTCATCAACGGCAGCATCAG CGGCAACACCGCCGCTCAGGGCCTTGAG CGGCTACCTGAATTACTTAAACAACATA AACCCCGTTGGGTACTGATAGAGCTGGG TGCCAACGATGGATTACGCGGTTTTCCT CCACAACACACCGAACAAGATCTACAAC AGATCATTACTTTAGTGAAACAAGCTAA TATTCAGCCTTTATTGATGCAGATCCGT CTACCACCAAACTATGGGCGCCGTTATA CCGAGTCTTTTGCCAAGATTTACCCCAA ACTGGCAGAATATAATCAAATTCCCCTG CTCCCGTTTTATATGGAGCAAGTCGCCA TTAAACCGGAGTGGGTGCAACAAGATGG GTTACATCCTAATCTGGCAGCCCAACCA TTTATCGCCGATTGGATGTCTGACACAC TATCAGCACATCTTAATTATTCTTAA (SEQ ID NO:64)	MADTLLILGDSLSAGYHLPIEQSWP ALMEKKWQKSGNKITVINGSISGNT AAQGLERLPELLKQHKPRWVLIELG ANDGLRGFPPQHTEQDLQQIITLVK QANIQPLLMQIRLPPNYGRRYTESF AKIYPKLAEYNQIPLLPFYMEQVAI KPEWVQQDGLHPNLAAQPFIADWMS DTLSAHLNYS (SEQ ID NO:63)
Pseudomonas putida	ATGGCAGGAACACTGCTGGTTGTTGGCG ATAGTATCAGCGCCGGTTTTGGCCTGGA TAGCCGTCAGGGCTGGGTGTCTCTCTTG CAGGCCCGTCTCAGGGACGAAGGTTTTG ACGACAAAGTGGTCAATGCTTCGATCAG TGGCGATACCAGCGCAGGTGGCCAGGCG	MAGTLLVVGDSISAGFGLDSRQGWV SLLQARLRDEGFDDKVVNASISGDT SAGGQARLPALLAAHKPSLVVLELG GNDGLRGQPPAQLQQNLASMIERSR QAGAKVLLLGMRLPPNYGVRYTTAF AKVYEQLAADKQVPLVPFFLEGVGG

	CGGCTGCCGGCGCTGCTTGCAGCACATA AACCGAGCCTGGTGGTGCTGGAGCTGGG CGGCAACGATGGCCTGCGCGGGCAGCCG CCTGCACAATTGCAACAAAATCTTGCCT CGATGATCGAGCGTTCGCGTCAGGCAGG GGCCAAGGTGCTGCTATTGGGCATGCGC CTGCCGCCCAATTATGGTGTGCGTTACA CCACCGCCTTTGCCAAGGTGTATGAACA GCTGGCAGCGGACAAACAGGTTCCCTTG GTGCCGTTTTTCCTCGAAGGGGTAGGGG GCGTACCTGAACTGATGCAGGCTGATGG CATCCATCCGGCCCAGGGGGCTCAGCAG CGCCTGCTGGAAAATGCCTGGCCAGCGA TAAAACCCTTGCTGTGA (SEQ ID NO:66)	VPELMQADGIHPAQGAQQRLLENAW PAIKPLL (SEQ ID NO:65)
Vibrio harveyi	ATGAGCGAAAAGCTACTTGTTTTGGGCG ACAGCCTGAGCGCTGGTTATCAAATGCC TATAGAGGAGAGTTGGCCTAGCTTACTC CCAGGCGCGTTATTAGAACATGGCCAAG ATGTAAAAGTTGTAAACGGTAGCATCTC TGGTGACACCACAGGCAATGGCCTTGCA CGGTTACCTTCTCTCCTTGAGCAACACA CGCCCGATTTGGTACTGATTGAGCTTGG CGCTAACGATGGCCTACGCGGTTTCCCA CCTAAACTTATTACGTTAAACCTATCGA AAATGATTACCATGATCAAAGATTCTGG TGCGGATGTCGTCATGATGCAAATCCGC GTCCCACCAAATTATGGTAAGCGTTACA GCGATATGTTCTACGACATCTACCCTAA	MSEKLLVLGDSLSAGYQMPIEESWP SLLPGALLEHGQDVKVVNGSISGDT TGNGLARLPSLLEQHTPDLVLIELG ANDGLRGFPPKLITLNLSKMITMIK DSGADVVMMQIRVPPNYGKRYSDMF YDIYPKLAEHQQVALMPFFLEHVII KPEWMMDDGLHPKPEAQPYIADFVA QELVKHL (SEQ ID NO:67)

	ACTGGCAGAACATCAGCAAGTAGCGCTA ATGCCGTTCTTCTTAGAGCATGTCATCA TTAAACCAGAATGGATGATGGACGATGG CTTGCACCCAAAACCGGAAGCTCAACCC TACATTGCTGACTTTGTCGCTCAAGAAT TGGTTAAACATCTCTAA (SEQ ID NO:68)	

Tabela 27: Alinhamento de sequências ‘TesA

```
‘TesA --MADTLLILGDSLSAGYRMSASAAWPALLNDKWQSKT---SVVNASISGDTSQQGLARL
55

PatrA --MADTLLILGDSLSAGYQMPAANAWPTLLNTQWQTQKKGIAVVNASISGDTTAQGLARL

PlumA --MADTLLILGDSLSAGYHLPIEQSWPALMEKKWQKSGNKITVINGSISGNTAAQGLERL

PproA MAWGNTLLVVGDSLSAGYQMRAEQSWPVLLQPALKQQGHEITVVNASISGDTTGNGLARL

VhA   --MSEKLLVLGDSLSAGYQMPIEESWPSLLPGALLEHGQDVKVVNGSISGDTTGNGLARL

PputA --MAGTLLVVGDSISAGFGLDSRQGWVSLLQARLRDEGFDDKVVNASISGDTSAGGQARL



‘TesA PALLKQHQPRWVLVELGGNDGLRGFQPQQTEQTLRQILQDVKAANAEPLLMQIRLPANYG
115

PatrA PALLKQHQPRWVLIELGGNDGLRGFPAPNIEQDLAKIITLVKQANAKPLLMQVRLPTNYG

PlumA PELLKQHKPRWVLIELGANDGLRGFPPQHTEQDLQQIITLVKQANIQPLLMQIRLPPNYG

PproA PTLLQQHKPAYVIIELGANDGLRGFPQGTIRNNLSQMITEIQNADAKPMLVQIKVPPNYG

VhA   PSLLEQHTPDLVLIELGANDGLRGFPPKLITLNLSKMITMIKDSGADVVMMQIRVPPNYG

PputA PALLAAHKPSLVVLELGGNDGLRGQPPAQLQQNLASMIERSRQAGAKVLLLGMRLPPNYG



‘TesA RRYNEAFSAIYPKLAKEFDVPLLPFFMEEVYLKPQWMQDDGIHPNRDAQPFIADWMAKQL
175

PatrA RRYTESFSNIYPKLAEQFALPLLPFFMEQVYLKPEWIMEDGIHPTRDAQPFIAEWMAKQL

PlumA RRYTESFAKIYPKLAEYNQIPLLPFYMEQVAIKPEWVQQDGLHPNLAAQPFIADWMSDTL

PproA KRYSDMFSSIYPQLSKELATPLLPFFLEQIILKQEWMMNDGLHPKSDAQPWIAEYMAENI

VhA   KRYSDMFYDIYPKLAEHQQVALMPFFLEHVIIKPEWMMDDGLHPKPEAQPYIADFVAQEL

PputA VRYTTAFAKVYEQLAADKQVPLVPFFLEGVGGVPELMQADGIHPAQGAQQRLLENAWPAI



‘TesA QPLVNHDS     183

PatrA EPLVNHES

PlumA SAHLNYS
```

PproA APYL VhA VKHL PputA KPLL.

EXEMPLO 37. PRODUÇÃO DE FAME NA AUSÊNCIA DE UMA CERA SINTASE EM FERMENTADORES

Esse Exemplo demonstra que um processo como descrito no Exemplo 36, *supra,* pode ser escalonado para produzir ésteres de ácido graxo em escala comercial de acordo com a presente invenção.

Células provenientes de um estoque congelado foram reavivadas em um caldo LB por 4-8 horas e então cultivadas em um meio definido contendo: 1,5 g/L de KH_2PO_4, 4,54 g/L de trihidrato de K_2HPO_4, 4 g/L de $(NH_4)_2SO_4$, 0,15 g/L de heptahidrato de $MgSO_4$, 20 g/L de glicose, 200 mM de tampão Bis-Tris (pH 7,2), 1,25, e 1,25 mL/L de uma solução de vitamina. solução de metais-traço consistia de 27 g/L de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 2 g/L de $ZnCl_2 \cdot 4H_2O$, 2 g/L de $CaCl_2 \cdot 6H_2O$, 2 g/L de $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 1,9 g/L de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0,5 g/L de H_3BO_3, e 100 mL/L de HCl concentrado. A solução de vitamina consistia de 0,42 g/L de riboflavina, 5,4 g/L de ácido pantotênico, 6 g/L de niacina, 1,4 g/L de piridoxina, 0,06 g/L de biotina, e 0,04 g/L de ácido fólico.

100 mL de uma cultura crescida durante a noite foi utilizada para inocular 2 litros do mesmo meio, porém com somente 2 g/L de glicose, em um fermentador sob temperatura, pH, agitação, aeração e oxigênio dissolvido extremamente controlados. As condições no fermentador eram 32°C, pH 6,8, nível de oxigênio

dissolvido (DO) igual a 30% de saturação. O pH foi mantido pela adição de NH_4OH, que também agiu como uma fonte de nitrogênio para crescimento celular. Quando a glicose inicial se tornou quase consumida, uma alimentação contendo glicose 60%, 3,9 g/L heptahidrato de $MgSO_4$ e 10 mL/L da solução de minerais-traço foi suprido ao fermentador. A taxa de alimentação foi ajustada para coincidir com a taxa de crescimento celular para evitar acúmulo de glicose no fermentador. Evitando-se o acúmulo de glicose, é possível reduzir ou eliminar a formação de produtos secundários tais como acetato, formato e etanol, que são por sua vez comumente produzidos por *E.coli*. Durante as primeiras 16-24 horas, a alimentação foi suprida exponencialmente, permitindo as células a crescer a uma taxa de crescimento fixa. Uma vez a taxa de alimentação tendo atingido um máximo desejado (de 6 a 10 g glicose/L fermentador/h) ela foi mantida naquele nível para o restante da corrida de fermentação. Nas fases iniciais do crescimento, a produção de FAME foi induzida pela adição de 1 mM de IPTG e 25 mL/L de metanol puro. A fermentação foi permitida a continuar por um período de 3 dias. Metanol foi adicionado várias vezes durante a corrida para recarregar o que foi consumido pelas células, porém a maior parte do que foi perdido por evaporação no gás de exaustão. As adições foram utilizados para manter a concentração de metanol no caldo de fermentação entre 10 e 30 mL/L, de modo a garantir produção eficiente enquanto evitando inibição de crescimento celular.

A progressão da fermentação foi seguido por medições de DO600 (densidade ótica a 600 nm), consumo de glicose, e produção de éster.

Consumo de glicose ao longo da fermentação foi analisado por Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC). A análise de HPLC foi desempenhada de acordo com métodos comumente utilizados para certos açúcares e ácidos orgânicos na arte, utilizando, por exemplo, as seguintes condições: Agilent HPLC 1200 Series com detector Refractive Index; Coluna: Aminex HPX-87H, 300 mm × 7,8 mm; temperatura da coluna: 35° C; fase móvel: 0,01 M H_2SO_4 (aquosa); taxa de escoamento: 0,6 mL/min; volume de injeção: 20 µl.

A produção de metil e etil ésteres de ácido graxo foi analisada através de cromatografia de gases com um detector de ionização de chama (GC-FID). As amostras do caldo de fermentação foram extraídos com acetato de etila em uma proporção de 1:1 vol/vol. Após agitação forte com vórtex, as amostras foram centrifugadas e a fase orgânica foi analisada através de cromatografia a gás (GC). As condições de análise foram como se seguem:

Instrumento: Trace GC Ultra, Thermo Electron Corporation com detector de ionização de chama (FID);

Coluna: DB-1 (1% de difenil siloxano; 99% de dimetil siloxano) CO1 UFM 1/0,1/5 01 DET da Thermo Electron Corporation, pH de fase 5, FT: 0,4 µm, comprimento 5m, id: 0,1mm;

Condições de entrada: splitless de 250°C, 3,8 minute método split 1/25 utilizado dependendo da concentração de amostra com escoamento split de 75 mL/min;

Gás carreador, taxa de escoamento: Hélio, 3,0 mL/min;

Temperatura do bloco: 330°C;

Temperatura do forno: 0,5 minuto mantido a 50°C; 100°C/minuto a 330°C; 0,5 minuto mantido a 330°C;

Temperatura do detector: 300°C;

Volume de injeção: 2 µL;

Tempo de corrida/taxa de escoamento: 6,3 min/3,0 mL/min (método splitless), 3,8 min/1,5 mL/min (método split 1/25), 3,04 min/1,2 mL/min (método split 1/50).

Esse protocolo foi aplicado nas corridas de fermentação de duas cepas diferentes: ID1 (MG1655 Δ*fadE::*P_{TRC} *tesA-fadD)* e IDG5 (MG1655 Δ*fadE* Δ*fhuA* Δ*adh* Δ*ldh* Δ*pflB ::* P_{TRC} *tesA,* P_{T5L}*fadD)*, nenhuma das quais continha o gene codificando para uma éster sintase. Células foram induzidas a 4 horas após inoculação por uma adição de IPTG, e metanol foi alimentado aos fermentadores para prover o álcool para produção de FAMEs. Em experimentos separados, as culturas foram alimentadas com glicose em duas taxas máximas de alimentação: 6 e 10 g/L/h.

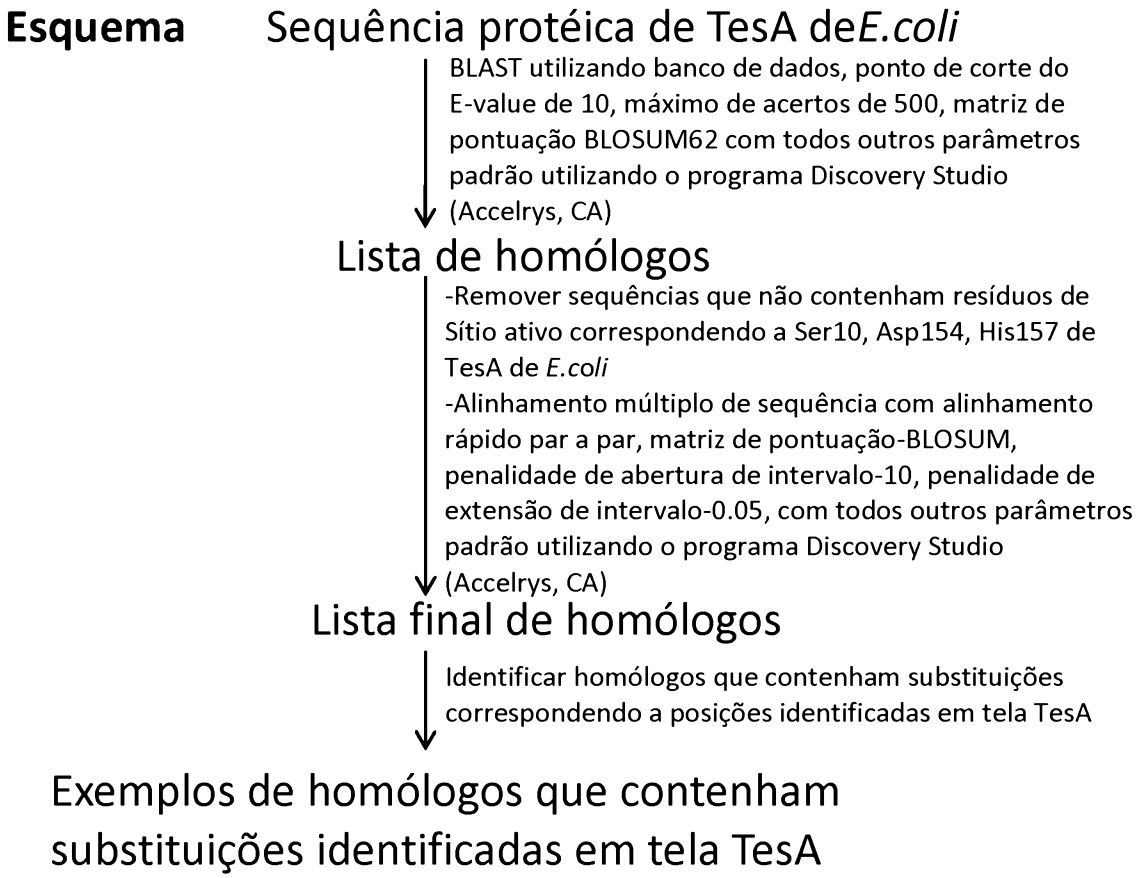
Com ambas as cepas e em cada taxa de alimentação de glicose, as culturas indicaram uma preferência para a produção de FAME sobre ácidos graxos livres, como mostrado nas **FIG. 37** e **FIG. 38.** Em fermentações de 70 horas, ID1 produziu por volta de 19 g/L de FAME e menos que 1 g/L de FFA quando alimentado a 6 g/L/h, e produziu 28 g/L de FAME e por volta de 1 g/L de FFA quando alimentado a 10 g/L/h. IDG5 produziu 20 g/L de FAME e menos que 1 g/L de FFA em alimentação com glicose menor, e produziu 25 g/L de FAME e por volta de 10 g/L de FFA em alimentação com glicose

maior.

EXEMPLO 38. IDENTIFICAÇÃO DE TIOESTERASES QUE OCORREM NA NATUREZA PARA PROPRIEDADES ALTERADAS BAEADAS EM RESULTADOS DE ENGENHARIA DE PROTEÍNAS

Experimentos de engenharia de 'TesA de *E.coli* conduzidos aqui são úteis na identificação de muitos resíduos de aminoácidos, as mutações das quais levam a propriedades alteradas. 'TesA é uma enzimas que pertence à família SGNH, uma ampla categoria de enzimas. É provável que outros homólogos de 'TesA possam também ser utilizados na produção de biodiesel utilizando as vias descritas aqui. Esse exemplo identifica homólogos de 'TesA com propriedades potencialmente alteradas como comparado com 'TesA. O método é descrito abaixo.

Homólogos de 'TesA foram identificados utilizando a estratégia descrita abaixo.



Os homólogos com substituições nas posições correspondendo àqueles identificados na tela 'TesA são mostrados no anexo 12. A ID do homólogo e o alinhamento de sequência próximo às posições de interesse são também mostrados.

EQUIVALENTES

Enquanto os exemplos específicos das invenções do assunto são explicitamente revelados aqui, a especificação e exemplos aqui acima são ilustrativos e não restritivos. Muitas variações das invenções irão se tornar aparentes àqueles versados na arte após revisão dessa especificação incluindo os exemplos. O escopo completo das invenções devem ser determinados por referência aos

exemplos, juntamente com seu escopo completo de equivalentes, e a especificação, juntamente com tais variações.

Todas as publicações, patentes, pedidos de patentes, e outras referências citadas nessa aplicação estão aqui incorporadas por referência na sua íntegra como se cada publicação, patente, pedido de patente ou outra referência fosse especificamente e individualmente indicada a ser incorporada por referência.

REIVINDICAÇÕES

1. Enzima tioesterase modificada que converte um substrato acil-ACP C10, C12 ou C14 em um derivado de ácido graxo com uma atividade maior quando comparado à tioesterase selvagem apresentando a sequência de aminoácido mostrada como SEQ ID NO:31, **caracterizada** pelo fato da tioesterase modificada apresentar uma substituição em uma ou mais posições de aminoácidos selecionados dentre os resíduos 45, 73, 78, 80, 101, 108, 111, 117, 118, 122, 145, 152 e 178 de SEQ ID NO:31, em que a metionina está na posição 0 e alanina está na posição 1 de SEQ ID NO:31, e em que (a) o resíduo de aminoácido na posição 45 ser alanina ou valina; (b) o resíduo de aminoácido na posição 73 ser cisteína ou valina; (c) o resíduo de aminoácido na posição 78 ser metionina; (d) o resíduo de aminoácido na posição 80 ser triptofano; (e) o resíduo de aminoácido na posição 101 ser leucina, alanina ou valina; (f) o resíduo de aminoácido na posição 108 ser triptofano; (g) o resíduo de aminoácido na posição 111 ser tirosina ou triptofano; (h) o resíduo de aminoácido na posição 117 ser arginina; (i) o resíduo de aminoácido na posição 122 ser arginina; (j) o resíduo de aminoácido na posição 145 ser alanina, cisteína, ácido aspártico, ácido glutâmico, isoleucina, leucina, metionina, glutamina, arginina, serina ou treonina; (k) o resíduo de aminoácido na posição 152 ser arginina; e (l) o resíduo de aminoácido na posição 178 ser treonina ou triptofano.

2. Tioesterase modificada, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato do resíduo de aminoácido na posição 73 ser uma cisteína, o resíduo de

aminoácido na posição 101 ser leucina, o resíduo de aminoácido na posição 111 ser tirosina, o resíduo de aminoácido na posição 145 ser cisteína e o resíduo de aminoácido na posição 178 ser treonina.

3. Tioesterase modificada, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato do resíduo de aminoácido na posição 111 ser tirosina e o resíduo de aminoácido na posição 145 ser cisteína.

4. Tioesterase modificada, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato do resíduo de aminoácido na posição 78 ser metionina, o resíduo de aminoácido na posição 108 ser triptofano e o resíduo de aminoácido na posição 145 ser cisteína.

5. Tioesterase modificada, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato do resíduo de aminoácido na posição 78 ser metionina, o resíduo de aminoácido na posição 108 ser triptofano e o resíduo de aminoácido na posição 145 ser leucina.

6. Polinucleotídeo que codifica a tioesterase modificada **caracterizado** por consistir na SEQ ID NO: 32.

7. Vetor de expressão **caracterizado** por compreender o polinucleotídeo como definido na reivindicação 6, operacionalmente ligado a um promotor.

8. Célula hospedeira de microorganismo **caracterizada** por compreender o polinucleotídeo, como definido na reivindicação 6, ou o vetor de expressão, como definido na reivindicação 7, em que a célula de microorganismo compreende uma célula de bactéria, cianobactéria, fungo, levedura ou alga.

9. Método de fabricação de composição de derivado de ácido graxo C10, C12 ou C14 utilizando microorganismos, **caracterizado** por compreender as seguintes etapas:

(a) cultivar a célula hospedeira, como definida na reivindicação 8, sob condições de cultura apropriada para expressão da tioesterase modificada, e

(b) recuperar a composição de derivado de ácido graxo a partir do sobrenadante da cultura da referida célula;

em que a composição de derivado de ácido graxo inclui um ou mais ésteres graxos selecionados dentre: etil decanoato, etil dodecanoato, etil tridecanoato, etil tetradecanoato, etil pentadecanoato, etil *cis*-9-hexadecenoato, etil hexadecanoato, etil heptadecanoato, etil *cis*-11-octadecenoato, etil octadecanoato, metil decanoato, metil dodecanoato, metil tridecanoato, metil tetradecanoato, metil pentadecanoato, metil *cis*-9-hexadecenoato, metil hexadecanoato, metil heptadecanoato, metil *cis*-11-octadecenoato, metil octadecanoato, octanoato de octila (C_8C_8) ou uma combinação destes; ou

em que a composição de derivado de ácido graxo inclui um ou mais ácidos graxos livres selecionados dentre: ácido octanóico, ácido decanóico, ácido dodecanóico, ácido tetradecanóico, ácido pentanóico, ácidos *cis*-9-hexadecenóico, ácido *cis*-11-octadecenóico, ou combinações destes; ou

em que a composição de derivado de ácido graxo inclui um ou mais álcoois graxos selecionados dentre: álcool graxo C10, C12, C14, C16 e C18 saturado.

FIGURA 1

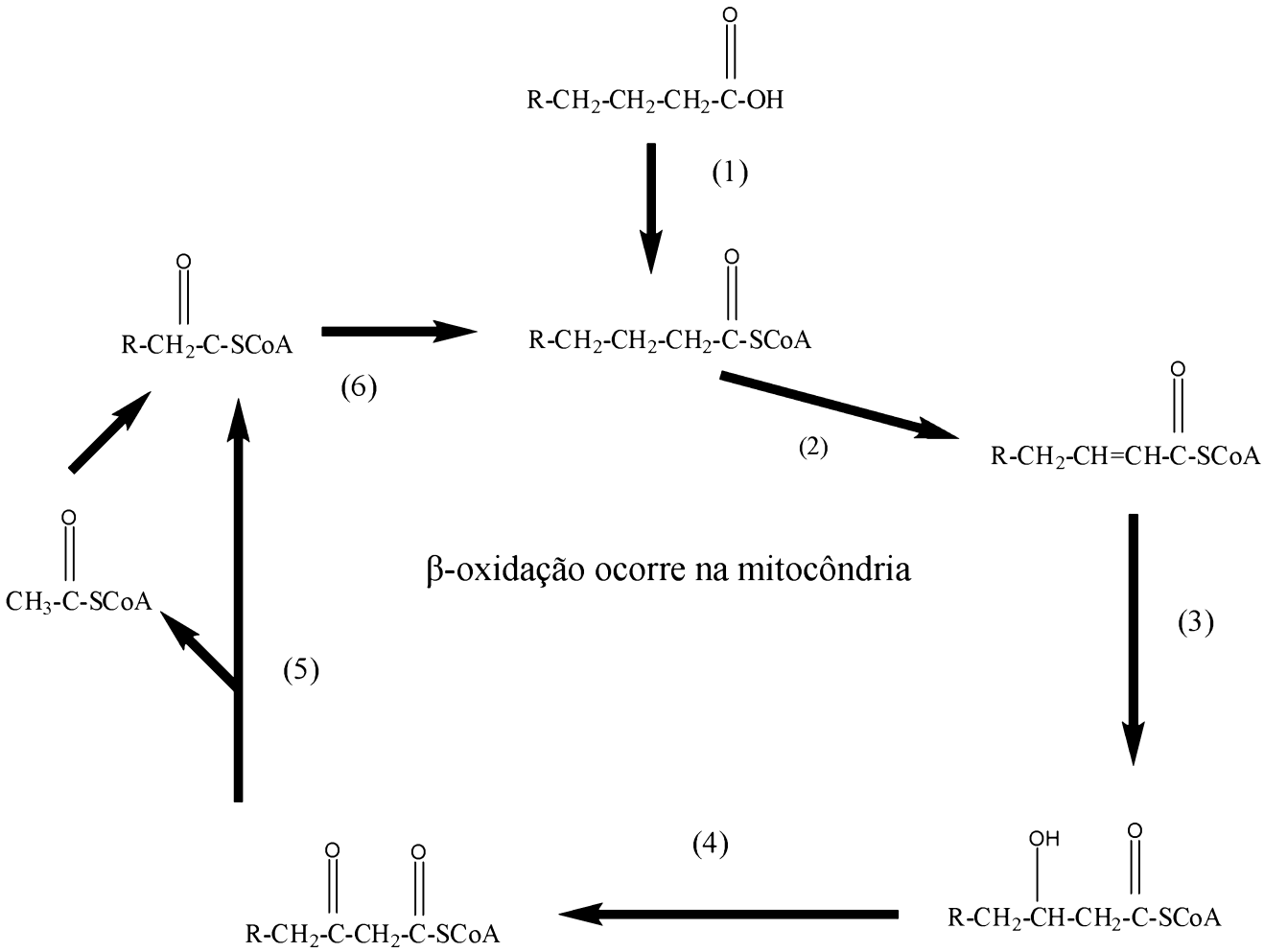

R-CH2-CH2-CH2-C-OH
(1)
R-CH2-CH2-CH2-C-SCoA
(2)
R-CH2-CH=CH-C-SCoA
(3)
OH
R-CH2-CH-CH2-C-SCoA
(4)
R-CH2-C-CH2-C-SCoA
(5)
CH3-C-SCoA
(6)
R-CH2-C-SCoA
β-oxidação ocorre na mitocôndria

FIGURA 2

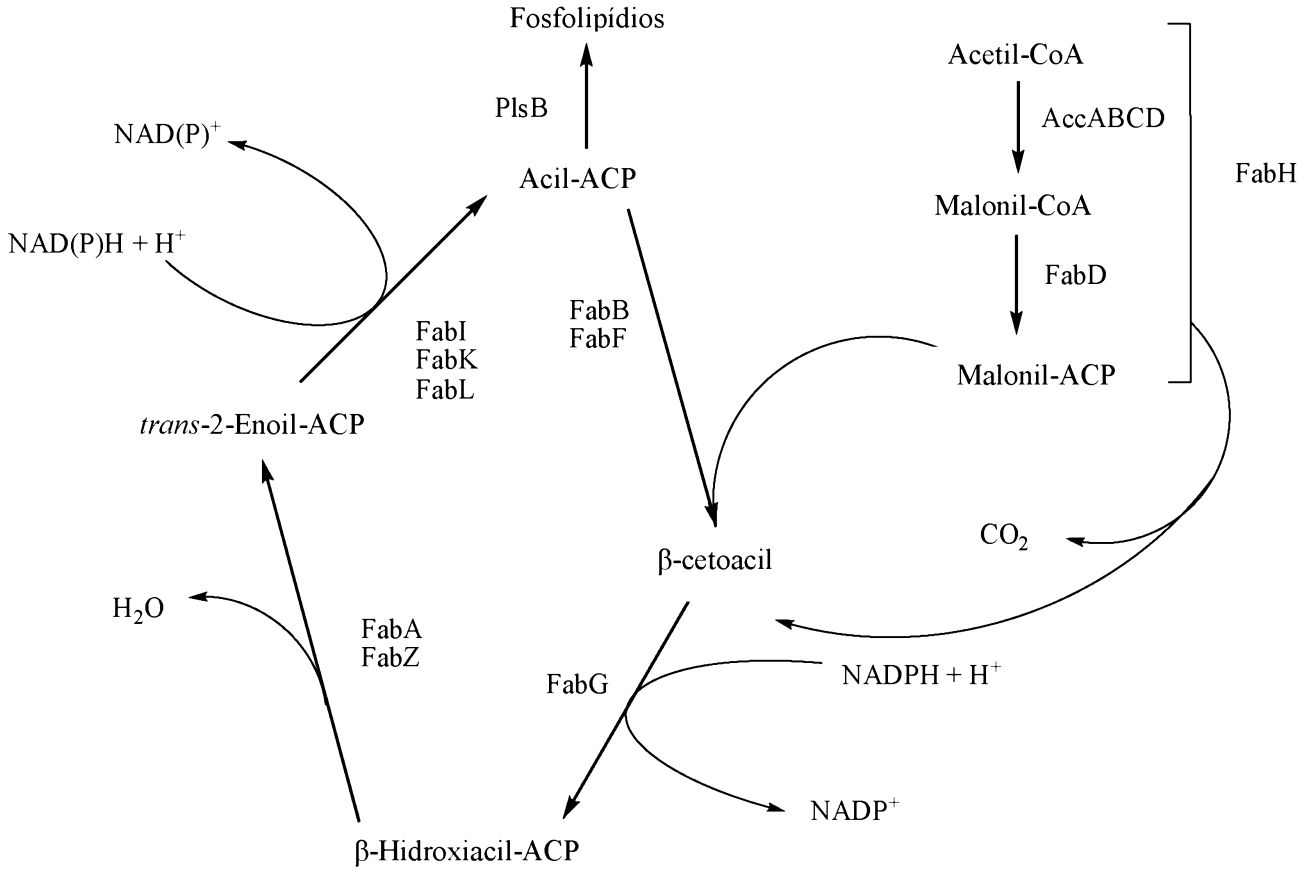
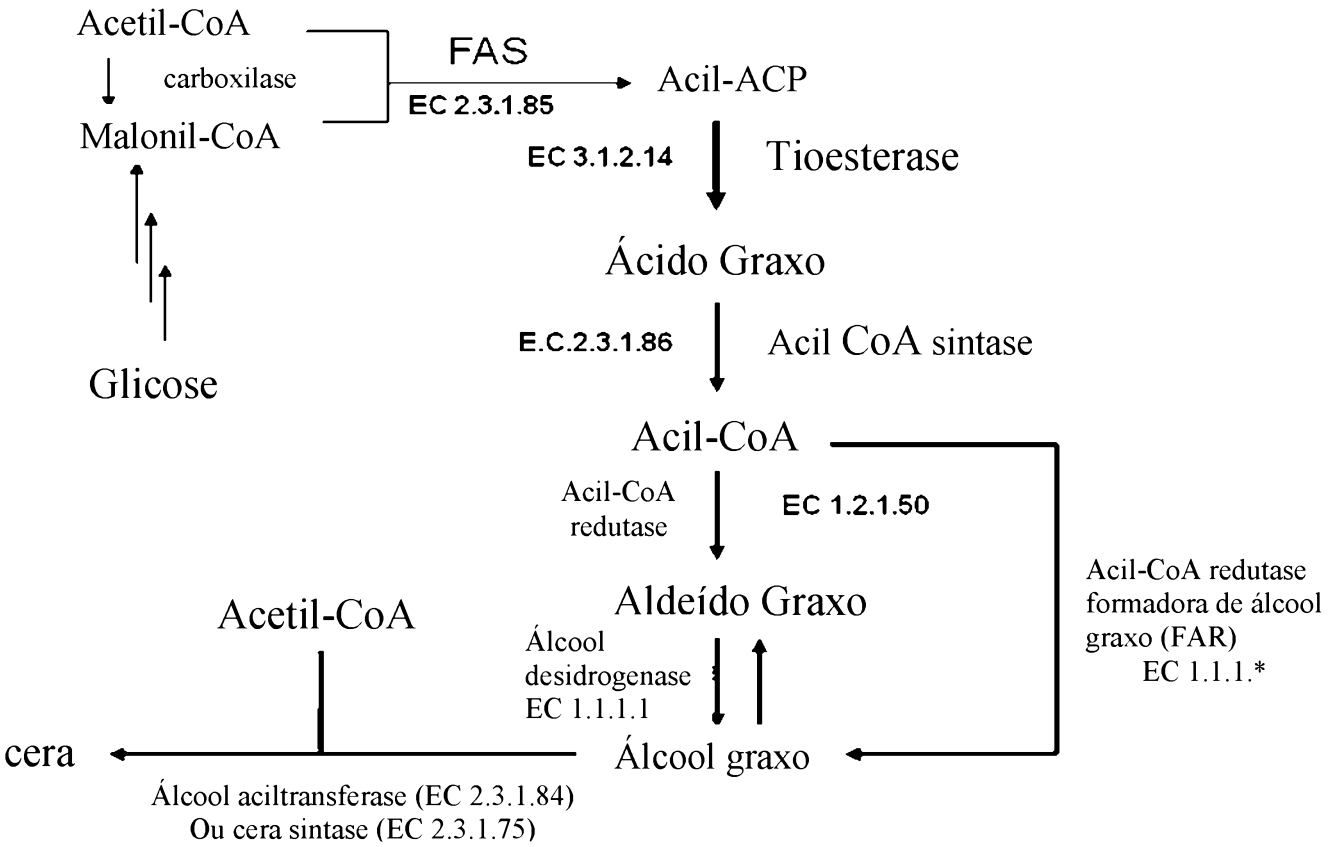

Fosfolipídios
PlsB
Acil-ACP
Acetil-CoA
AccABCD
Malonil-CoA
FabD
Malonil-ACP
FabH
NAD(P)+
NAD(P)H + H+
FabI
FabK
FabL
FabB
FabF
trans-2-Enoil-ACP
β-cetoacil
CO2
H2O
FabA
FabZ
FabG
NADPH + H+
NADP+
β-Hidroxiacil-ACP

FIGURA 3



Referências de Acil-CoA redutase formadora de Álcool graxo: Kalscheurer 2006; Metz 2000; Cheng 2004a

FIGURA 4

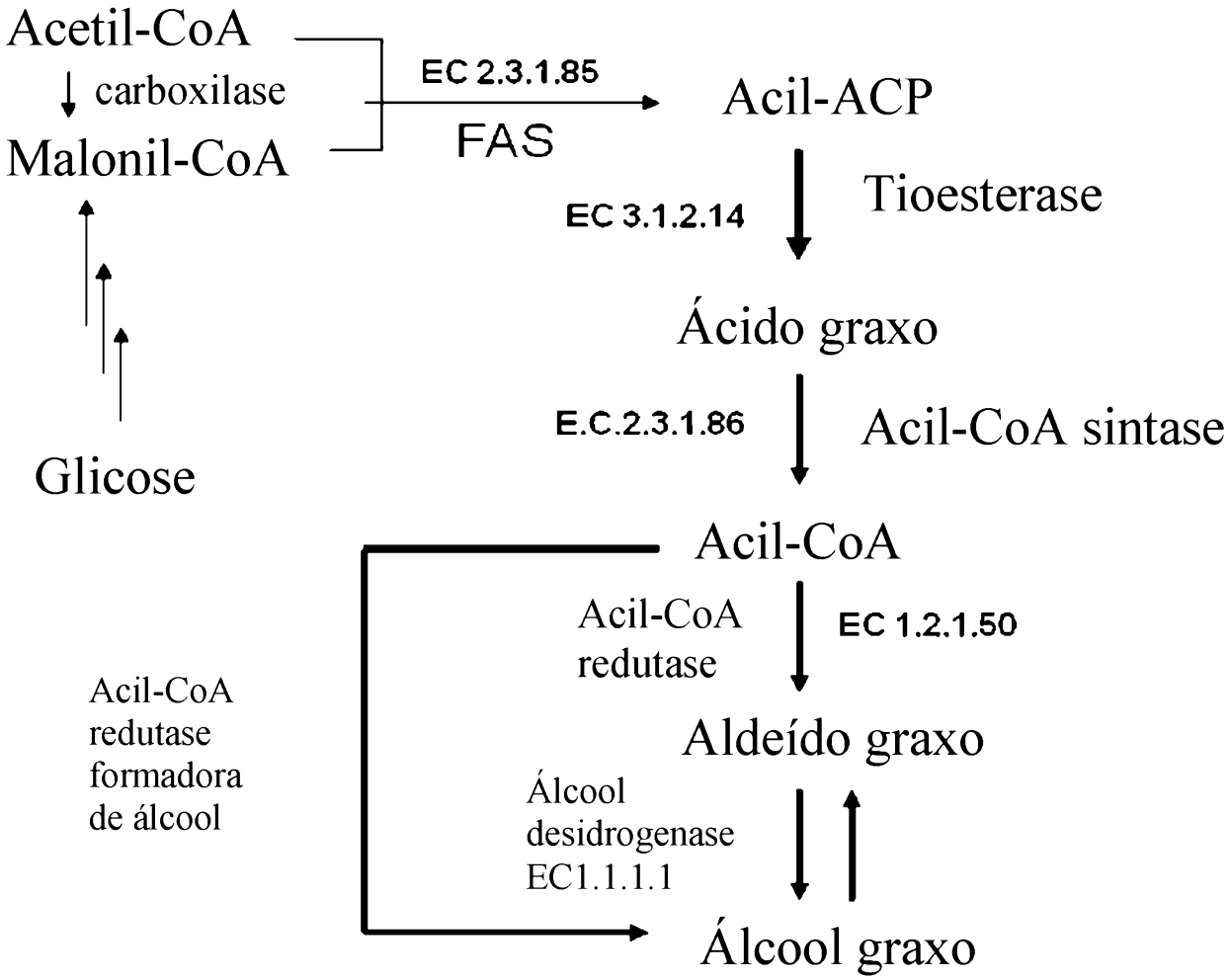

Acetil-CoA
carboxilase
Malonil-CoA
EC 2.3.1.85
FAS
Acil-ACP
EC 3.1.2.14
Tioesterase
Ácido graxo
E.C.2.3.1.86
Acil-CoA sintase
Glicose
Acil-CoA
Acil-CoA redutase
EC 1.2.1.50
Aldeído graxo
Acil-CoA redutase formadora de álcool
Álcool desidrogenase EC1.1.1.1
Álcool graxo

FIGURA 5

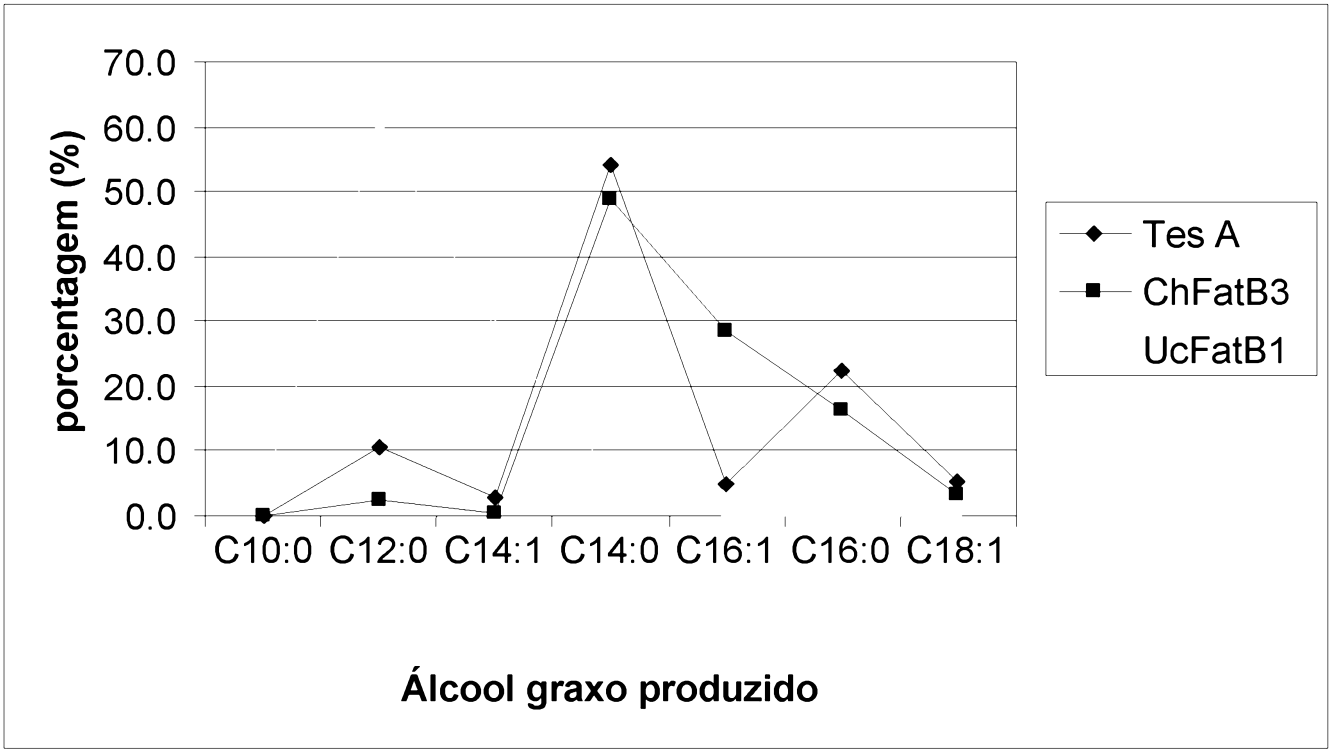

70.0
60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
porcentagem (%)
C10:0 C12:0 C14:1 C14:0 C16:1 C16:0 C18:1
Álcool graxo produzido
Tes A
ChFatB3
UcFatB1

FIGURA 6

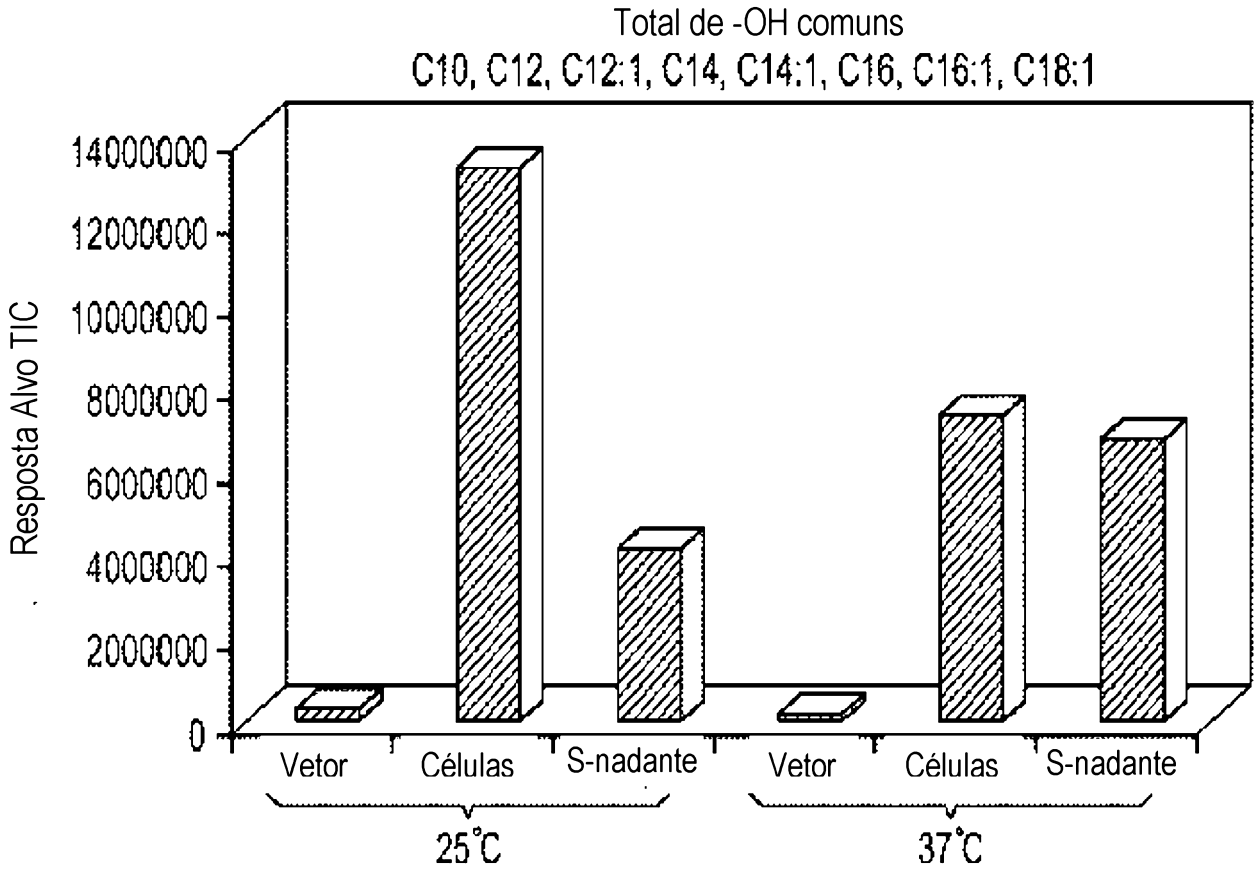

Total de -OH comuns
C10, C12, C12:1, C14, C14:1, C16, C16:1, C18:1
Resposta Alvo TIC
14000000
12000000
10000000
8000000
6000000
4000000
2000000
0
Vetor
Células
S-nadante
Vetor
Células
S-nadante
25°C
37°C

FIGURA 7

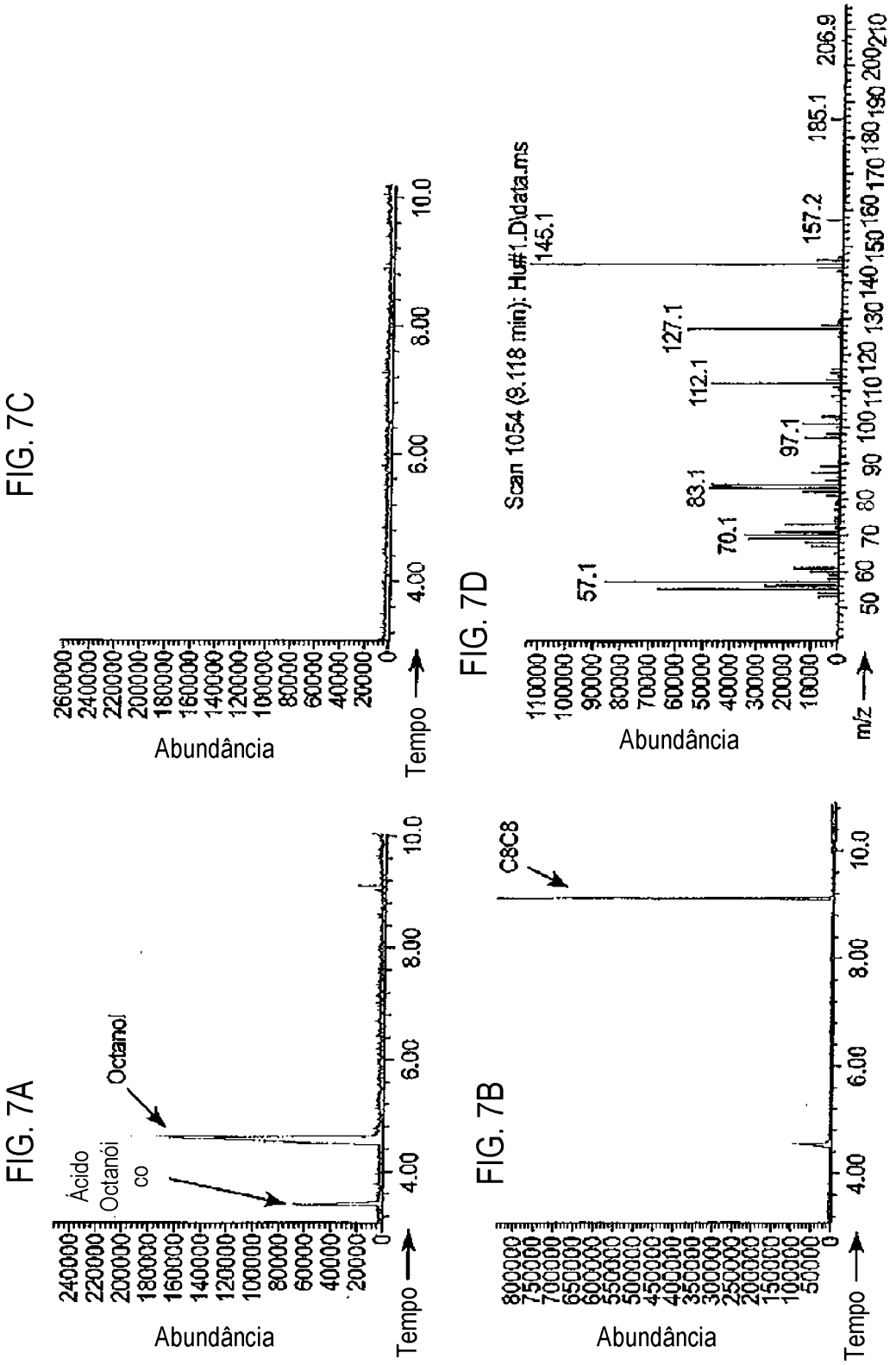

FIG. 7A
Ácido Octanóico
Octanol
Abundância
Tempo
FIG. 7B
C8C8
Abundância
Tempo
FIG. 7C
Abundância
Tempo
FIG. 7D
Scan 1054 (9.118 min): Hu#1.Didata.ms
145.1
157.2
185.1
206.9
57.1
70.1
83.1
97.1
112.1
127.1
Abundância
m/z

FIGURA 8

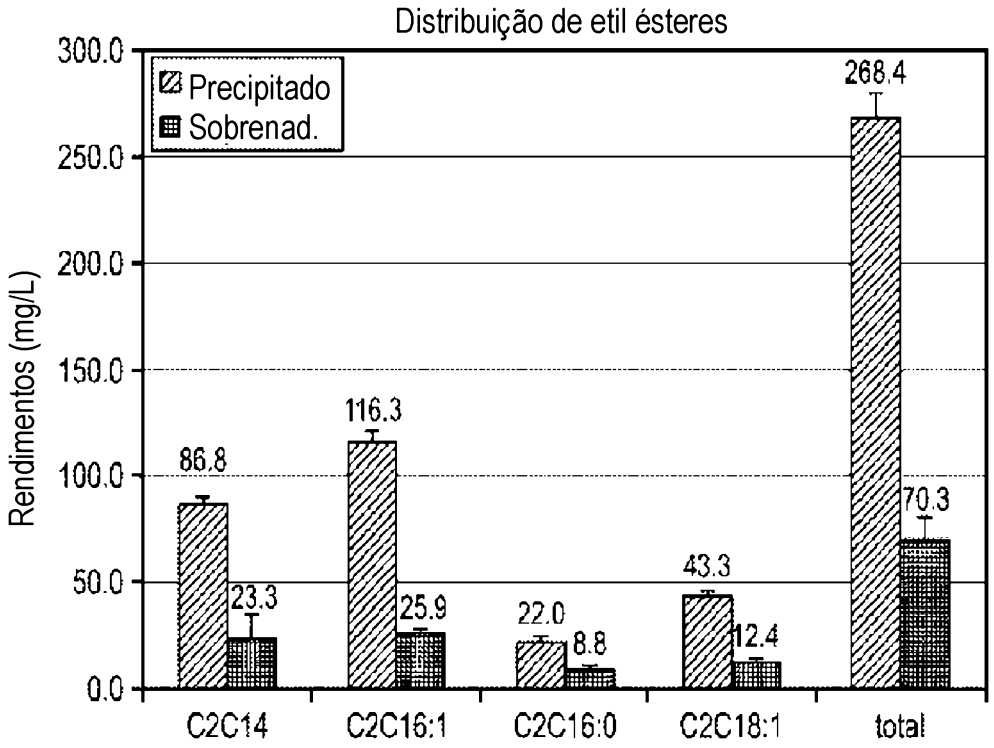

Distribuição de etil ésteres
Precipitado
Sobrenad.
Rendimentos (mg/L)
300.0
250.0
200.0
150.0
100.0
50.0
0.0
86.8
23.3
116.3
25.9
22.0
8.8
43.3
12.4
268.4
70.3
C2C14
C2C16:1
C2C16:0
C2C18:1
total

FIGURA 9

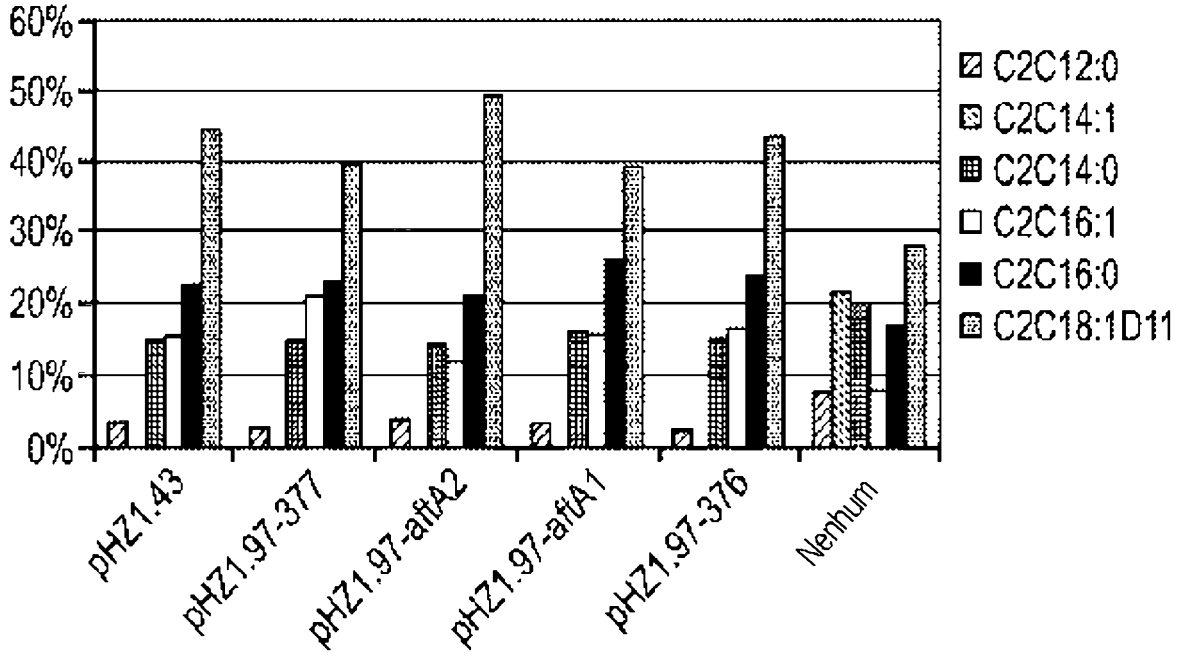

60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
C2C12:0
C2C14:1
C2C14:0
C2C16:1
C2C16:0
C2C18:1D11
pHZ1.43
pHZ1.97-377
pHZ1.97-aftA2
pHZ1.97-aftA1
pHZ1.97-376
Nenhum

FIGURA 10

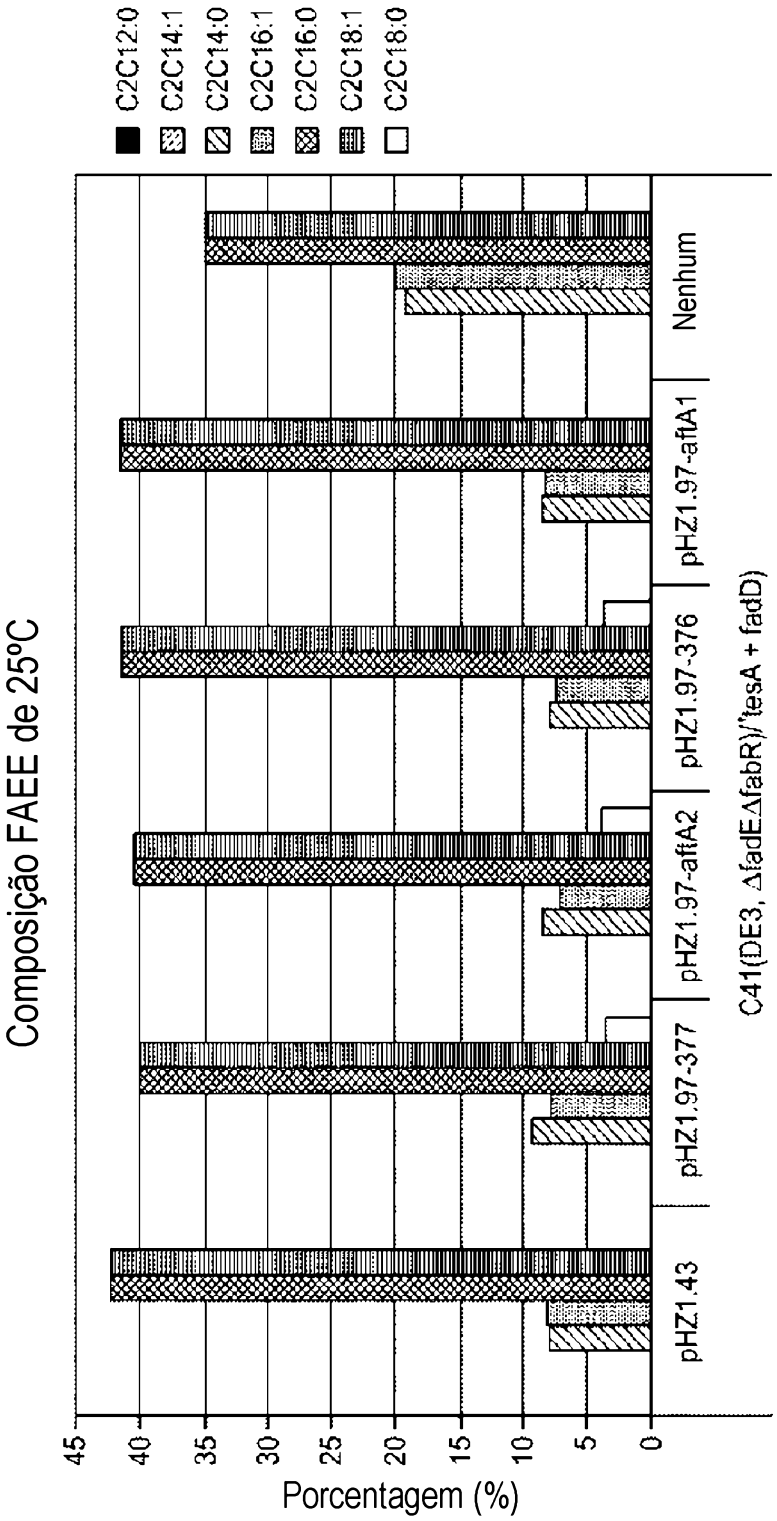

C2C12:0
C2C14:1
C2C14:0
C2C16:1
C2C16:0
C2C18:1
C2C18:0
Composição FAEE de 25°C
Porcentagem (%)
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
pHZ1.43
pHZ1.97-377
pHZ1.97-atfA2
pHZ1.97-376
pHZ1.97-atfA1
Nenhum
C41(DE3, ΔfadEΔfabR)/'tesA + fadD)

FIGURA 11

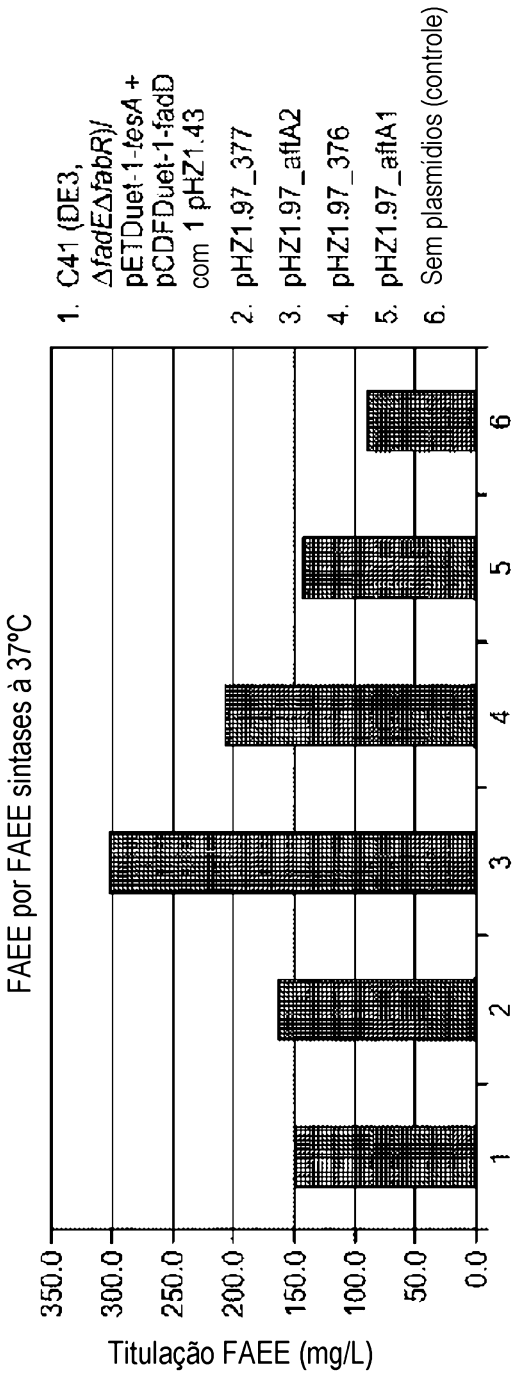

1. C41 (DE3, ΔfadEΔfabR)/ pETDuet-1-tesA + pCDFDuet-1-fadD com 1 pHZ1.43
2. pHZ1.97_377
3. pHZ1.97_aftA2
4. pHZ1.97_376
5. pHZ1.97_aftA1
6. Sem plasmídios (controle)
FAEE por FAEE sintases à 37°C
Titulação FAEE (mg/L)
350.0
300.0
250.0
200.0
150.0
100.0
50.0
0.0
1
2
3
4
5
6

FIGURA 12

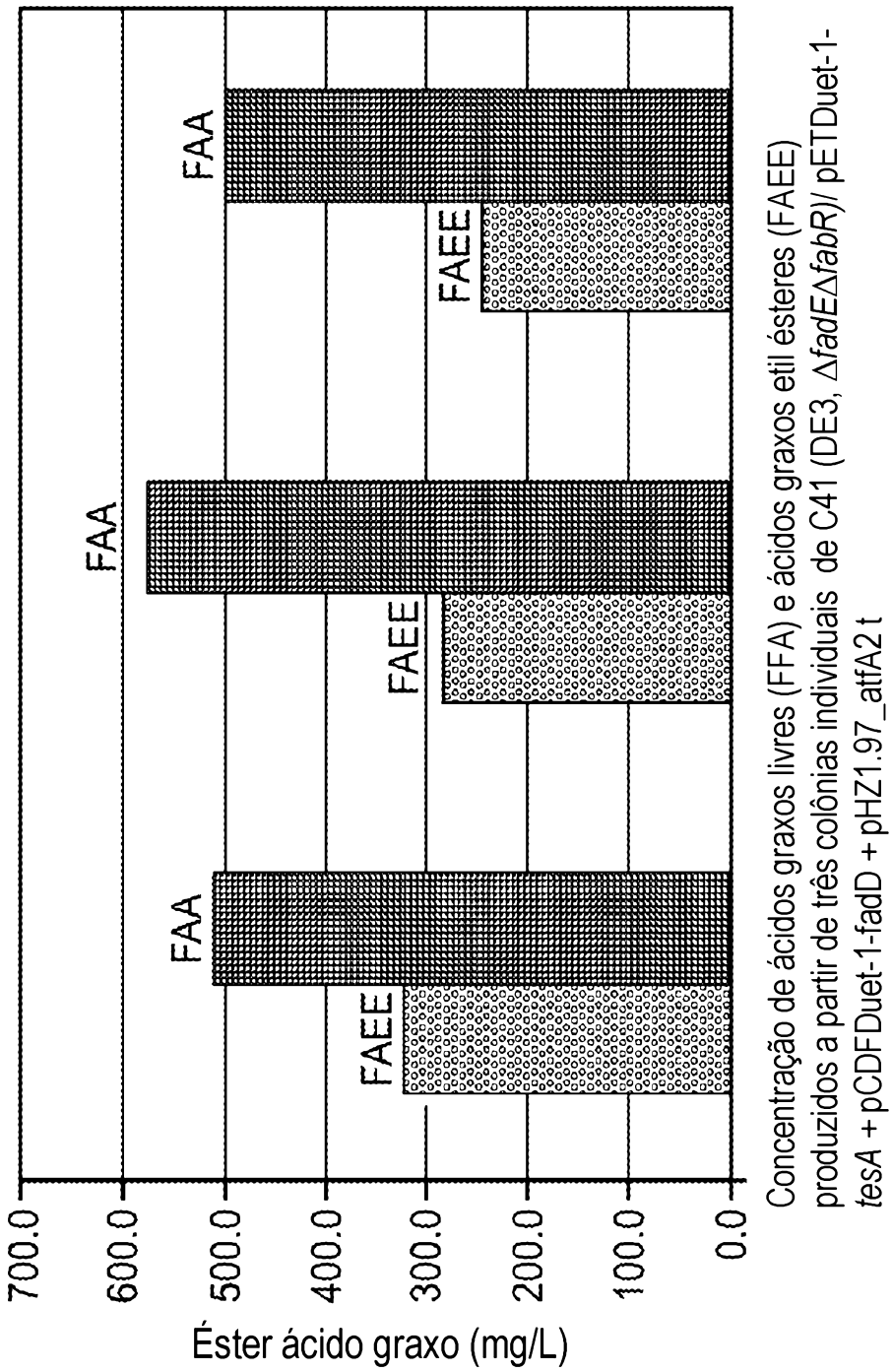

FAA
FAEE
FAA
FAEE
FAA
FAEE
700.0
600.0
500.0
400.0
300.0
200.0
100.0
0.0
Éster ácido graxo (mg/L)
Concentração de ácidos graxos livres (FFA) e ácidos graxos etil ésteres (FAEE) produzidos a partir de três colônias individuais de C41 (DE3, ΔfadEΔfabR)/ pETDuet-1-tesA + pCDFDuet-1-fadD + pHZ1.97_atfA2 t

FIGURA 13



FIGURA 14

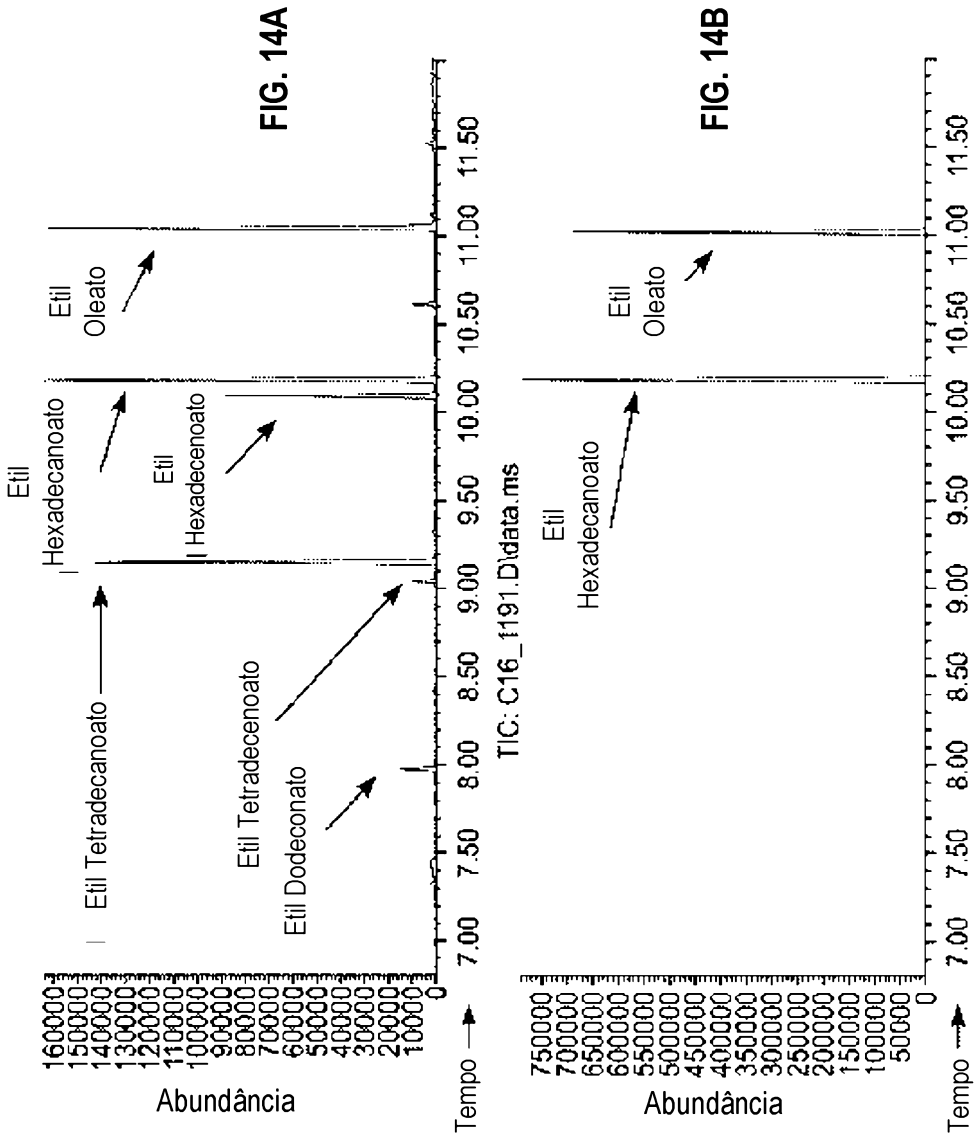

FIG. 14A
Etil Hexadecanoato
Etil Tetradecanoato
Etil Dodeconato
Etil Tetradecenoato
Etil Hexadecenoato
Etil Oleato
TIC: C16_1191.D\data.ms
Abundância
Tempo
FIG. 14B
Etil Hexadecanoato
Etil Oleato
Abundância
Tempo

FIGURA 15 (ex-16)

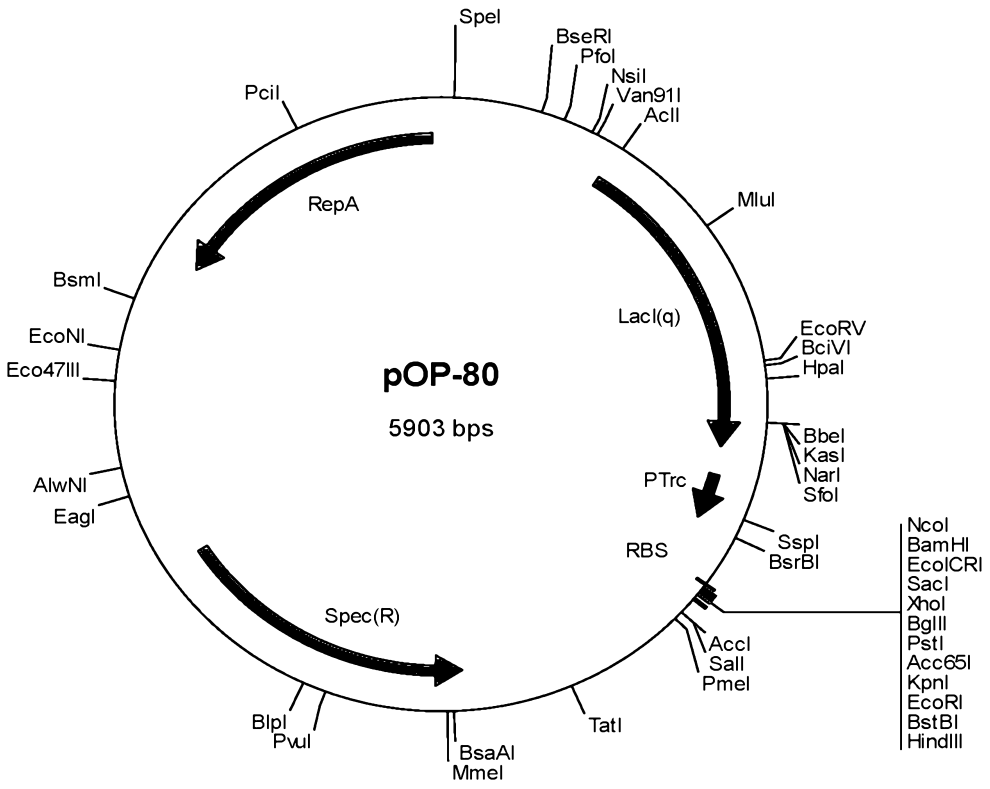
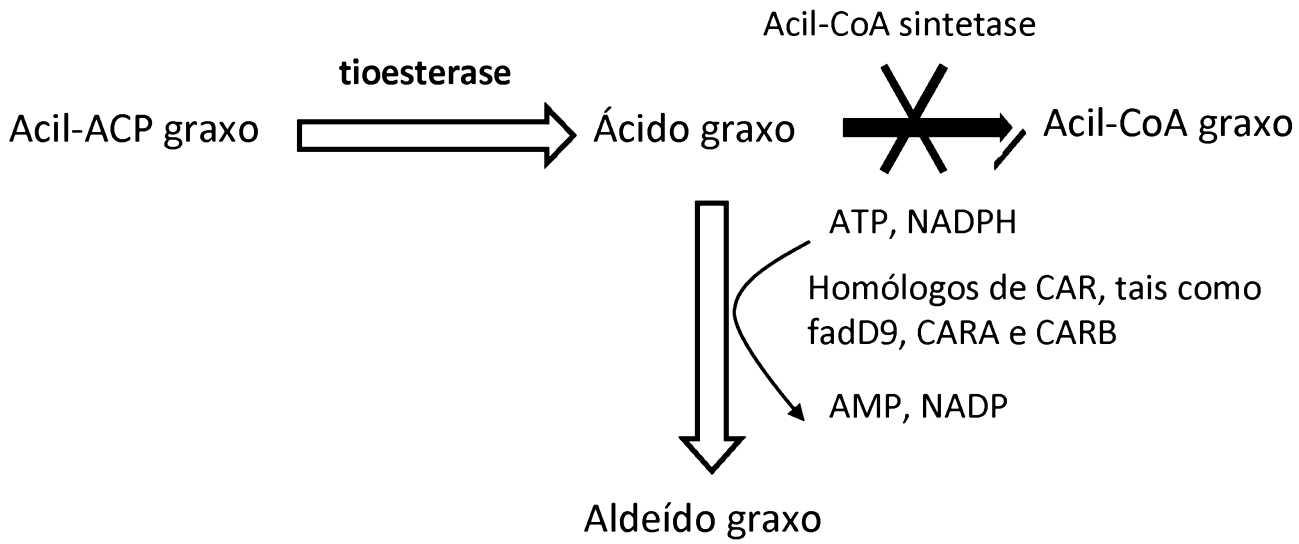


FIGURA 16


Acil-CoA sintetase
tioesterase
Acil-ACP graxo
Ácido graxo
Acil-CoA graxo
ATP, NADPH
Homólogos de CAR, tais como
fadD9, CARA e CARB
AMP, NADP
Aldeído graxo

FIGURAS 17A e 17B

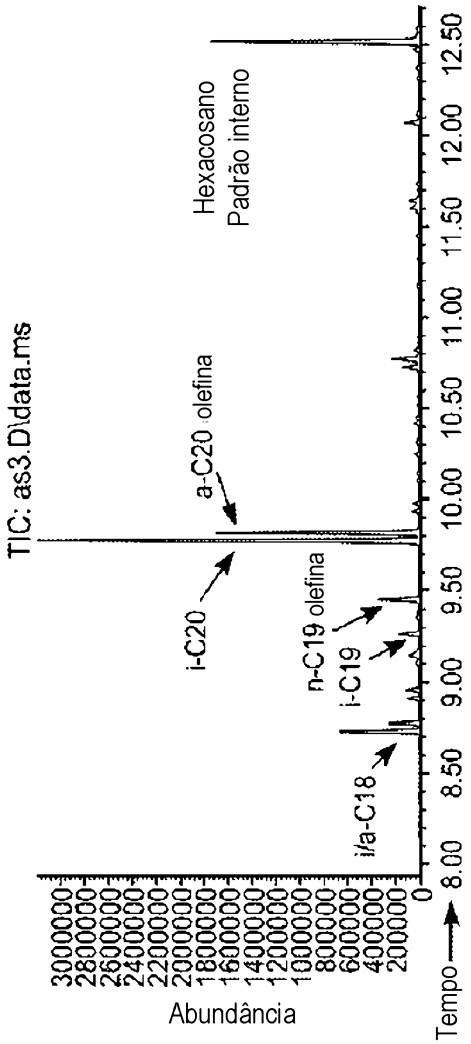


FIGURA 17A

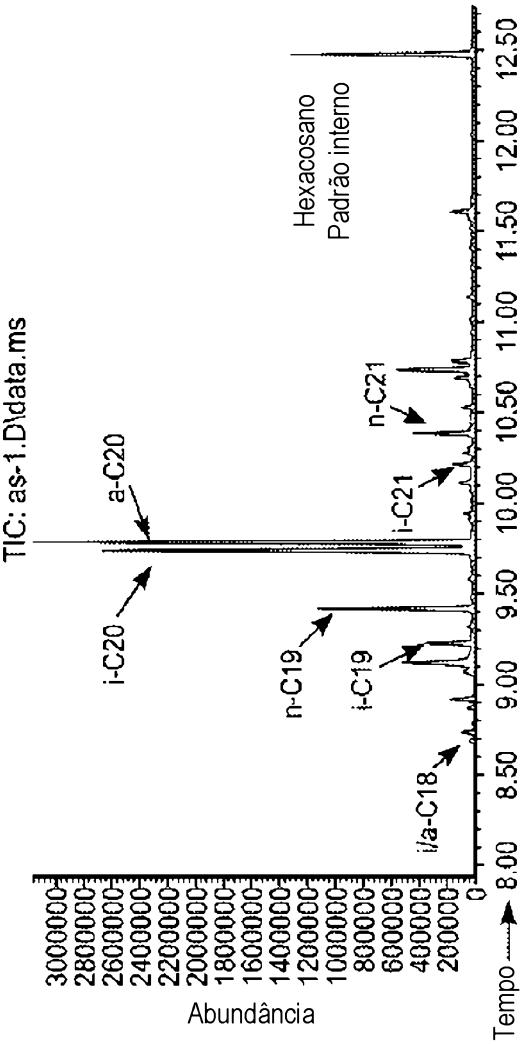


FIGURA 17B

FIGURAS 18A e 18B

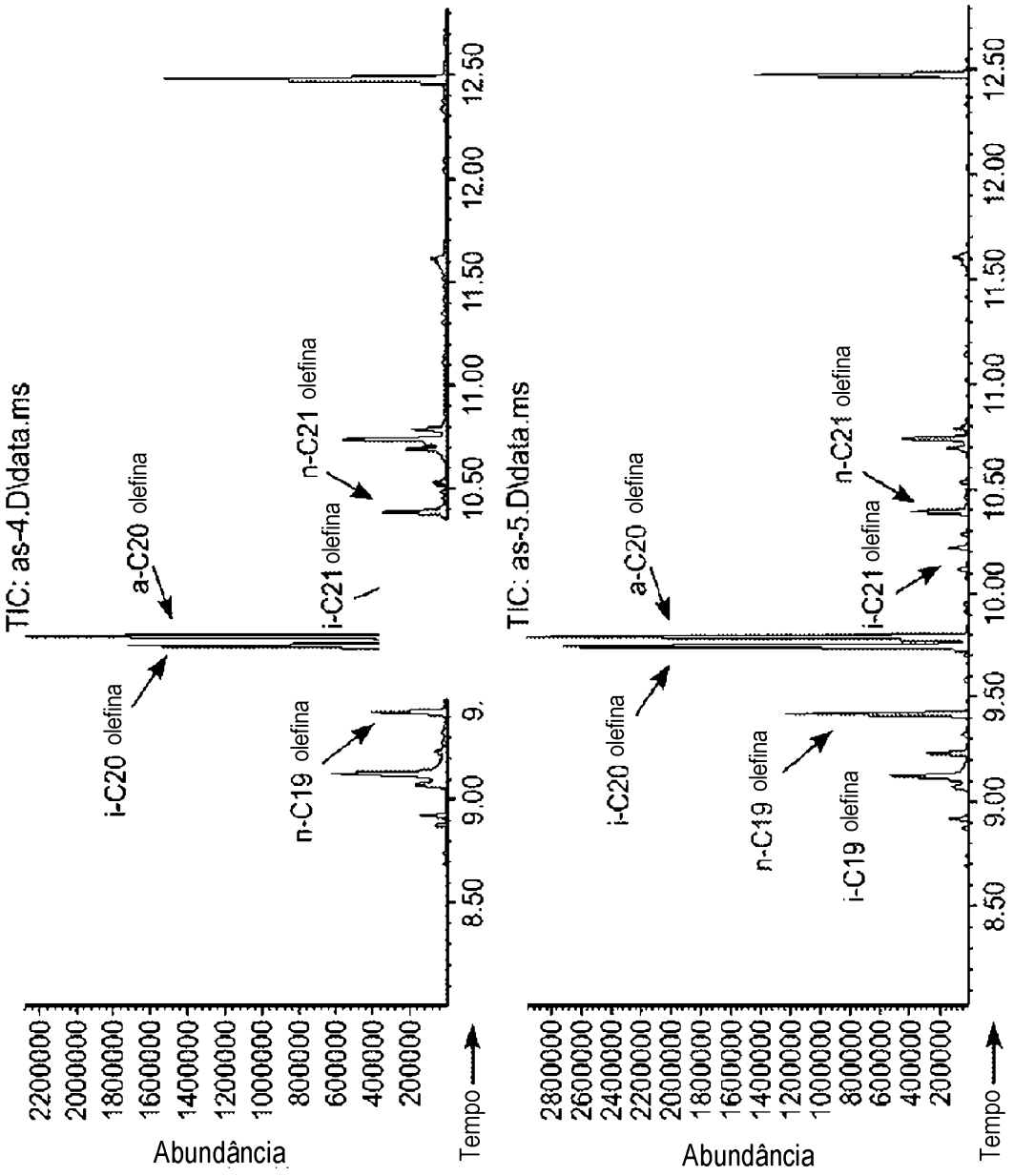


FIGURA 18A

FIGURA 18B

FIGURA 19A

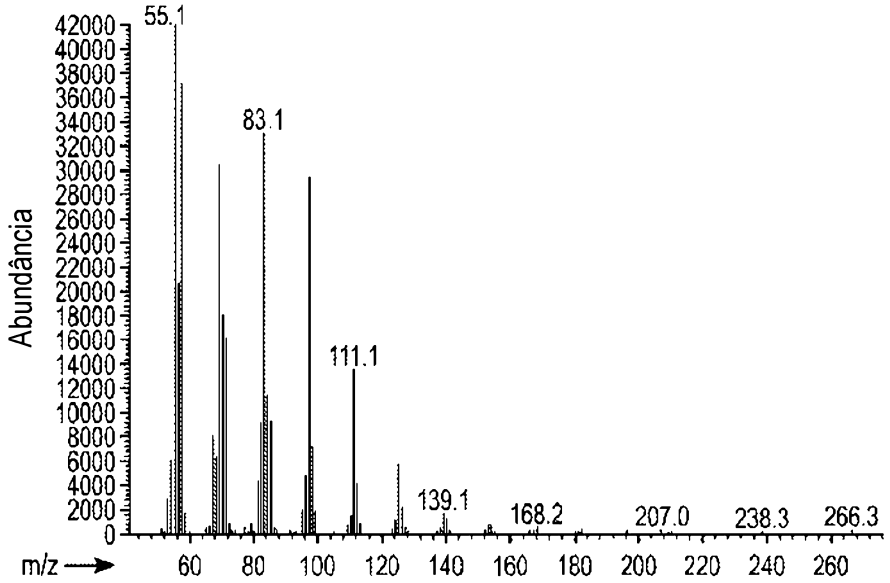


FIGURA 19B

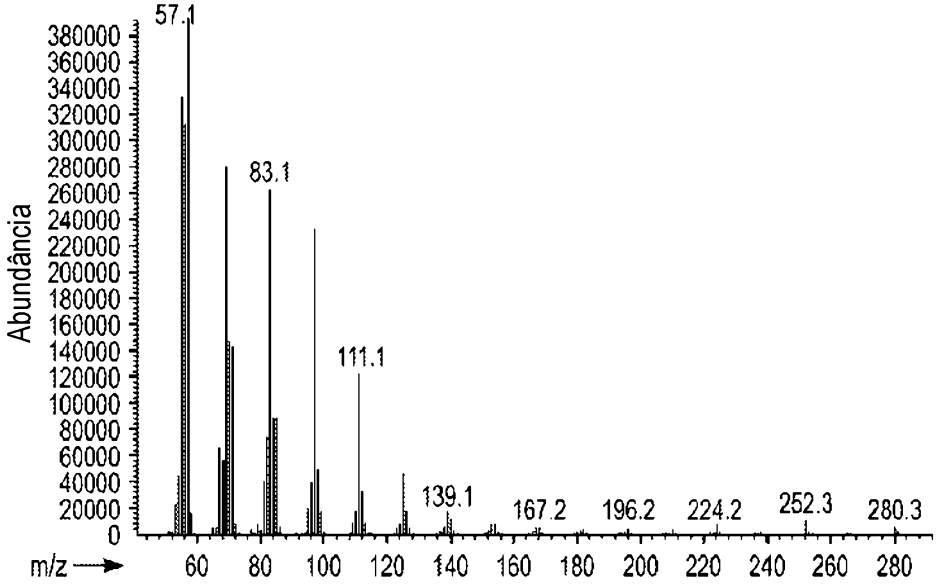


FIGURA 20

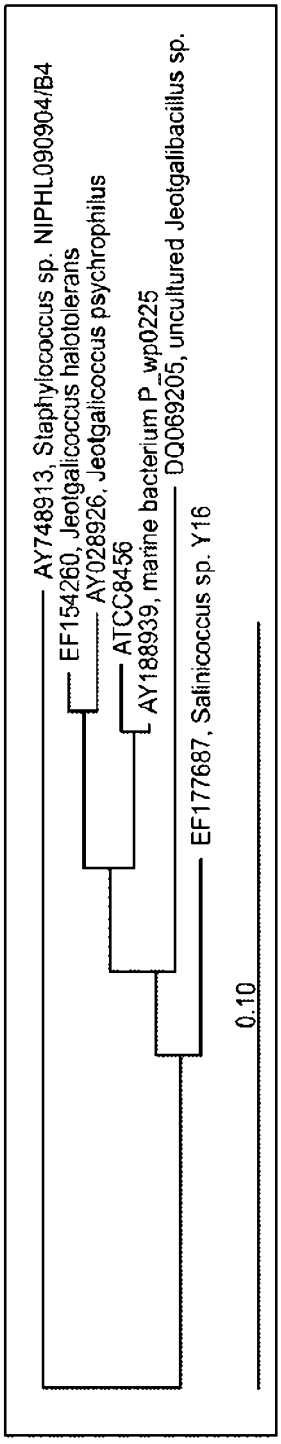

AY748913, Staphylococcus sp. NIPHL090904/B4
EF154260, Jeotgalicoccus halotolerans
AY028926, Jeotgalicoccus psychrophilus
ATCC8456
AY188939, marine bacterium P_wp0225
DQ069205, uncultured Jeotgalibacillus sp.
EF177687, Salinicoccus sp. Y16
0.10

FIGURA 21A

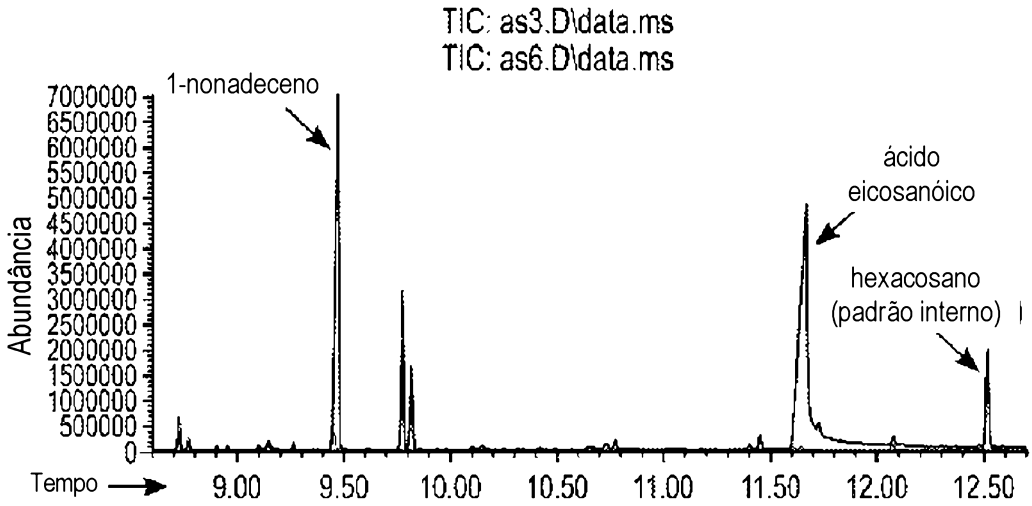


FIGURA 21B

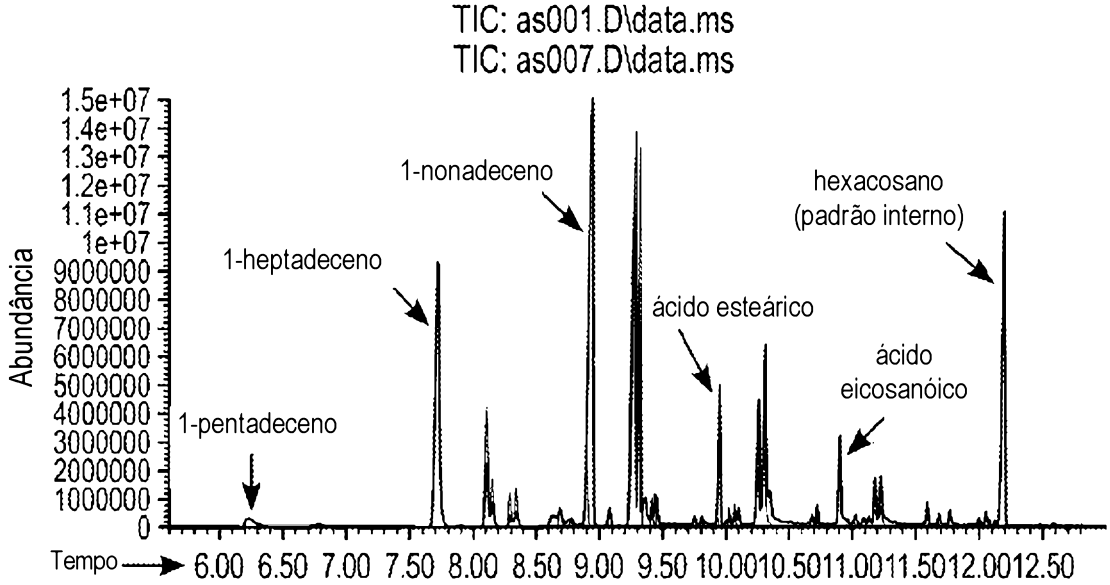


FIGURA 22

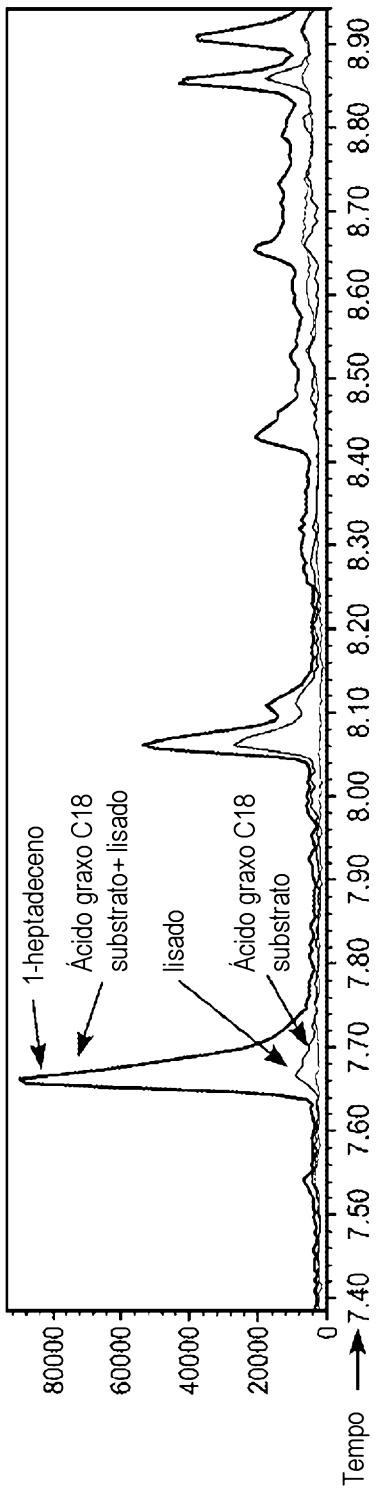

1-heptadeceno
Ácido graxo C18
substrato+ lisado
lisado
Ácido graxo C18
substrato
80000
60000
40000
20000
0
7.40
7.50
7.60
7.70
7.80
7.90
8.00
8.10
8.20
8.30
8.40
8.50
8.60
8.70
8.80
8.90
Tempo

FIGURA 23

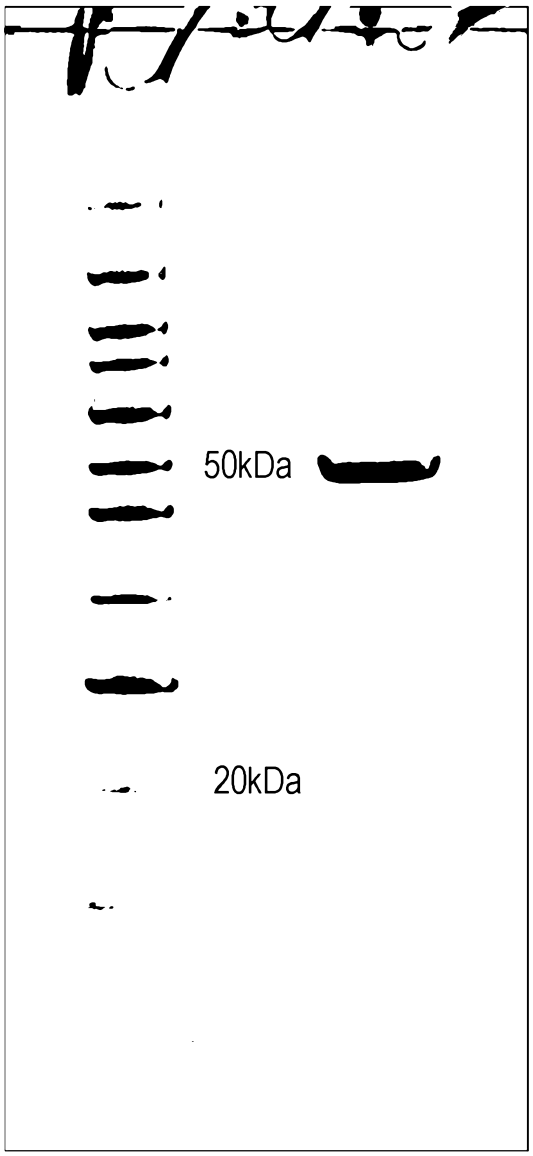


FIGURA 24

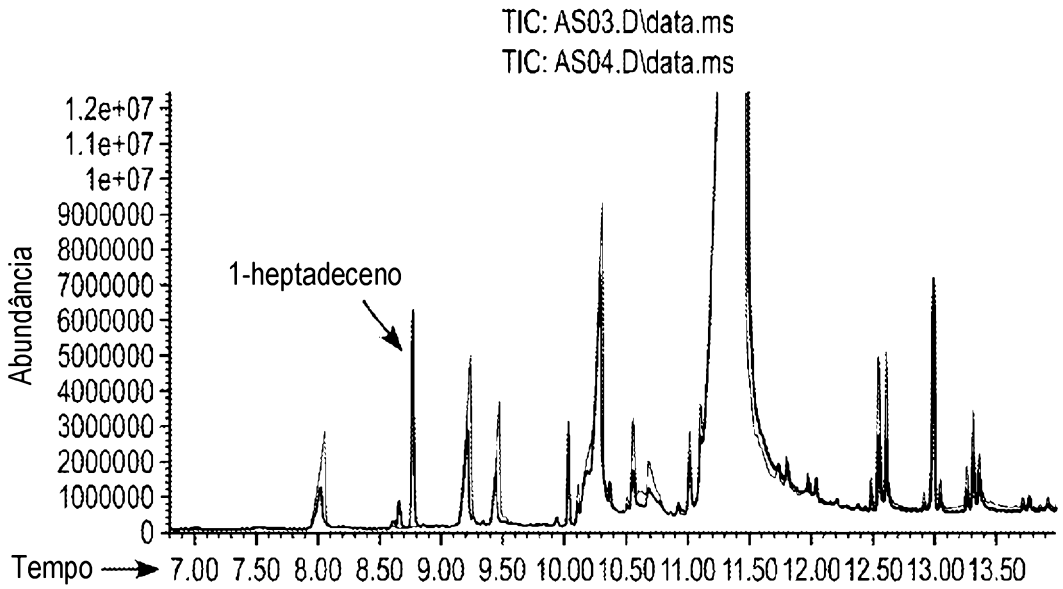

TIC: AS03.D\data.ms
TIC: AS04.D\data.ms
1-heptadeceno
Abundância
1.2e+07
1.1e+07
1e+07
9000000
8000000
7000000
6000000
5000000
4000000
3000000
2000000
1000000
0
Tempo
7.00 7.50 8.00 8.50 9.00 9.50 10.00 10.50 11.00 11.50 12.00 12.50 13.00 13.50

FIGURA 25

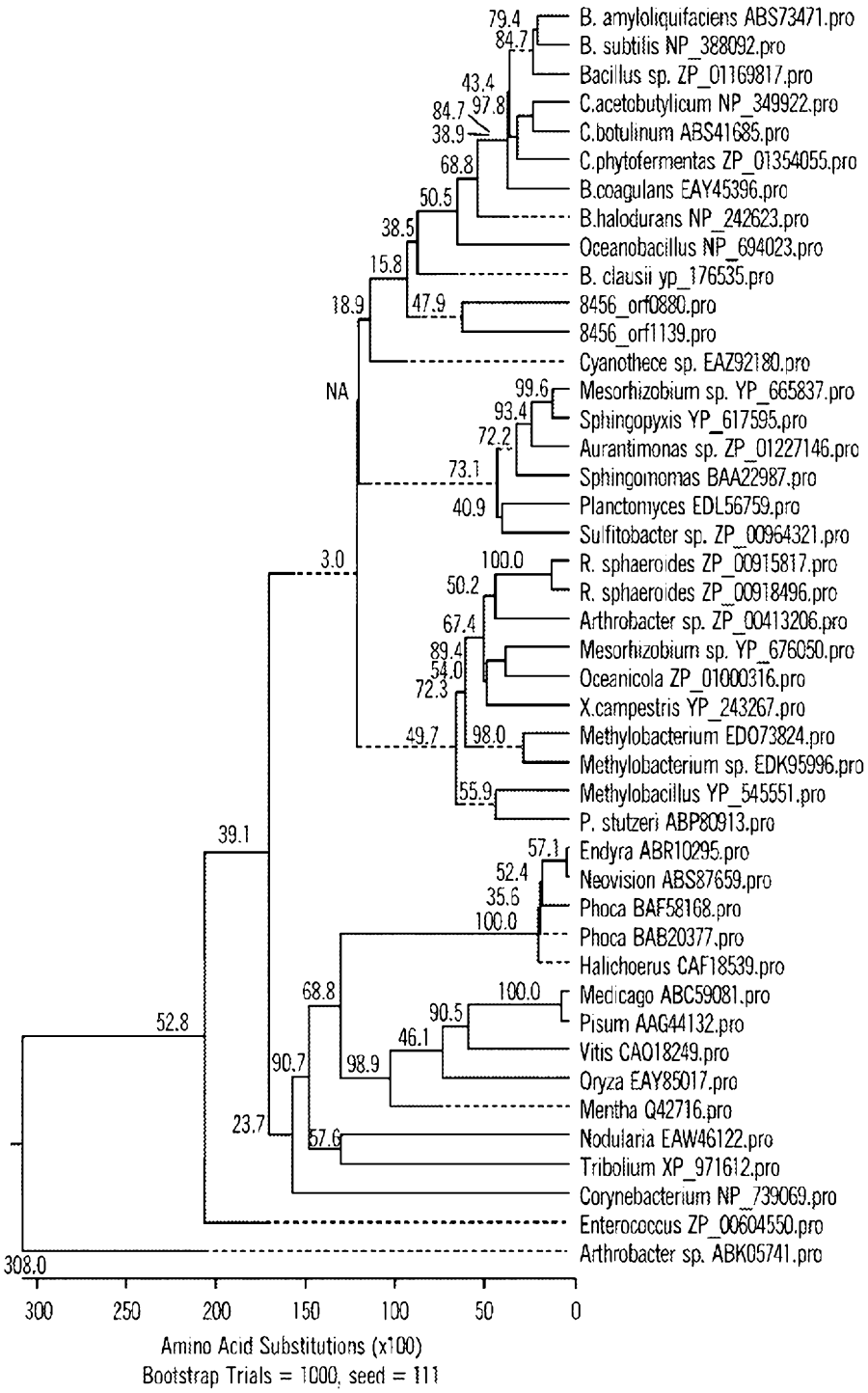

B. amyloliquifaciens ABS73471.pro
B. subtilis NP_388092.pro
Bacillus sp. ZP_01169817.pro
C.acetobutylicum NP_349922.pro
C.botulinum ABS41685.pro
C.phytofermentas ZP_01354055.pro
B.coagulans EAY45396.pro
B.halodurans NP_242623.pro
Oceanobacillus NP_694023.pro
B. clausii yp_176535.pro
8456_orf0880.pro
8456_orf1139.pro
Cyanothece sp. EAZ92180.pro
Mesorhizobium sp. YP_665837.pro
Sphingopyxis YP_617595.pro
Aurantimonas sp. ZP_01227146.pro
Sphingomonas BAA22987.pro
Planctomyces EDL56759.pro
Sulfitobacter sp. ZP_00964321.pro
R. sphaeroides ZP_00915817.pro
R. sphaeroides ZP_00918496.pro
Arthrobacter sp. ZP_00413206.pro
Mesorhizobium sp. YP_676050.pro
Oceanicola ZP_01000316.pro
X.campestris YP_243267.pro
Methylobacterium EDO73824.pro
Methylobacterium sp. EDK95996.pro
Methylobacillus YP_545551.pro
P. stutzeri ABP80913.pro
Endyra ABR10295.pro
Neovision ABS87659.pro
Phoca BAF58168.pro
Phoca BAB20377.pro
Halichoerus CAF18539.pro
Medicago ABC59081.pro
Pisum AAG44132.pro
Vitis CAO18249.pro
Oryza EAY85017.pro
Mentha Q42716.pro
Nodularia EAW46122.pro
Tribolium XP_971612.pro
Corynebacterium NP_739069.pro
Enterococcus ZP_00604550.pro
Arthrobacter sp. ABK05741.pro
79.4
84.7
43.4
84.7
97.8
38.9
68.8
50.5
38.5
15.8
18.9
47.9
NA
99.6
93.4
72.2
73.1
40.9
3.0
100.0
50.2
67.4
89.4
54.0
72.3
49.7
98.0
55.9
39.1
57.1
52.4
35.6
100.0
68.8
100.0
90.5
52.8
46.1
90.7
98.9
23.7
57.6
308.0
300
250
200
150
100
50
0
Amino Acid Substitutions (x100)
Bootstrap Trials = 1000, seed = 111

FIGURA 26

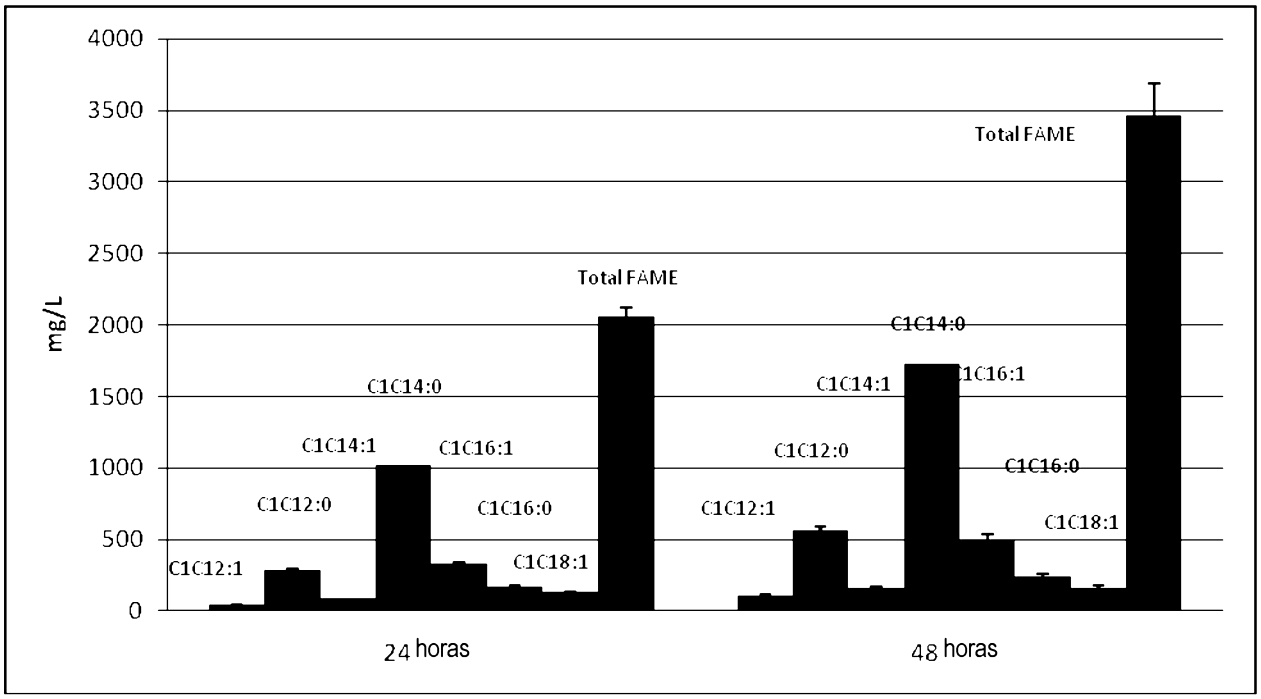


FIGURA 27

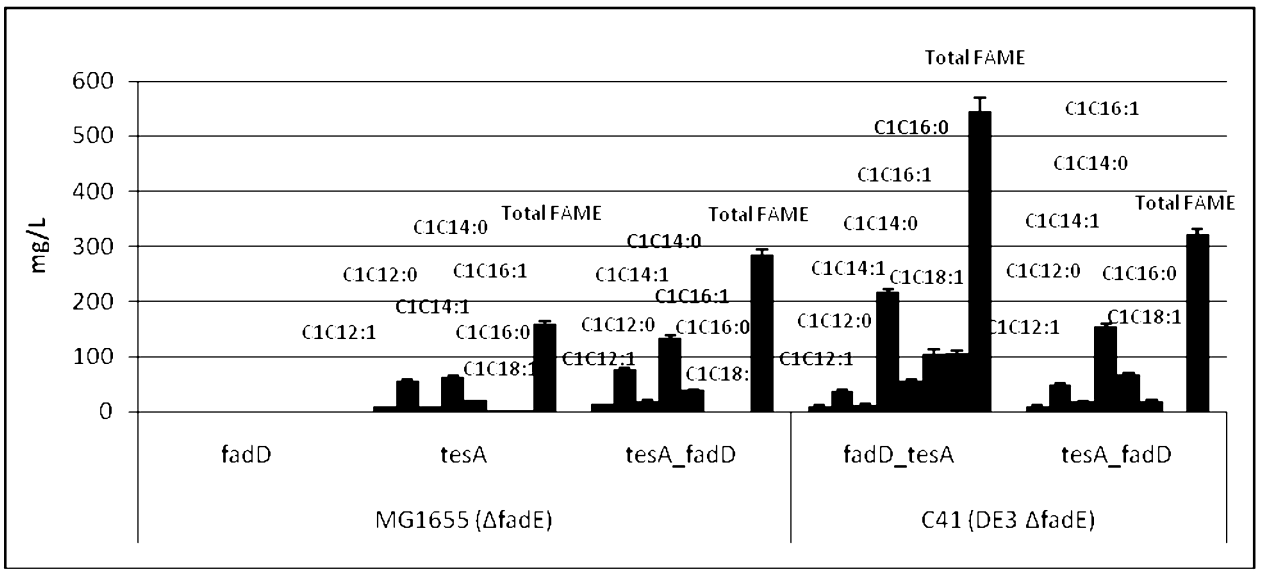


FIGURA 28

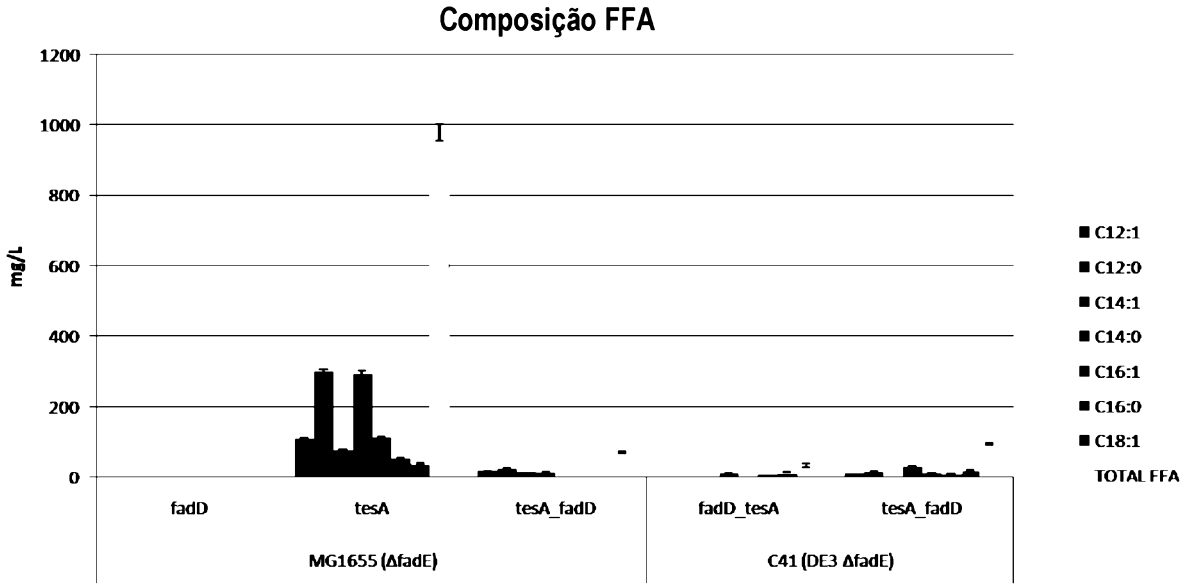


FIGURA 29

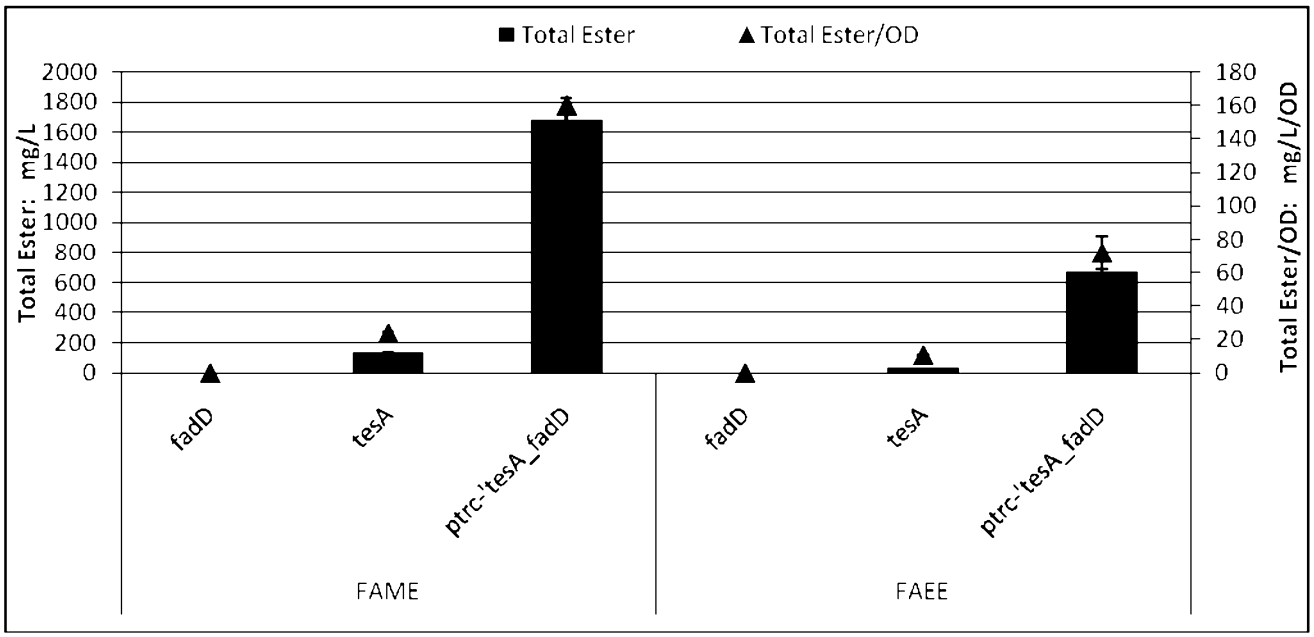


FIGURA 30

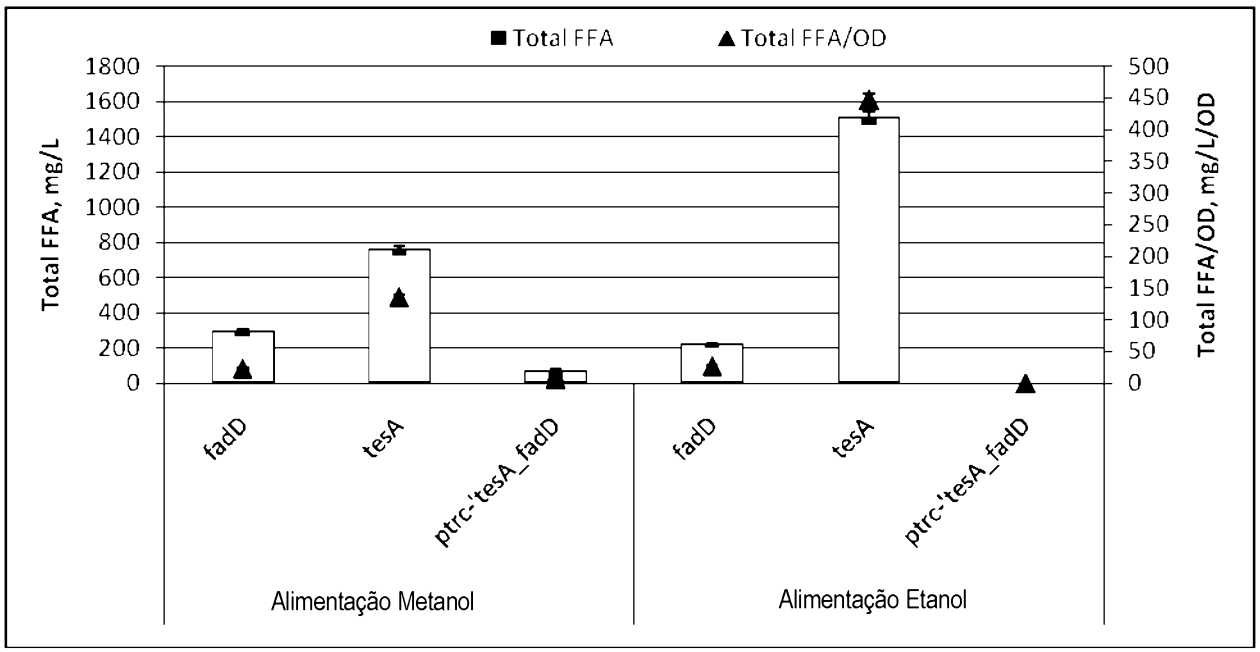


FIGURA 31

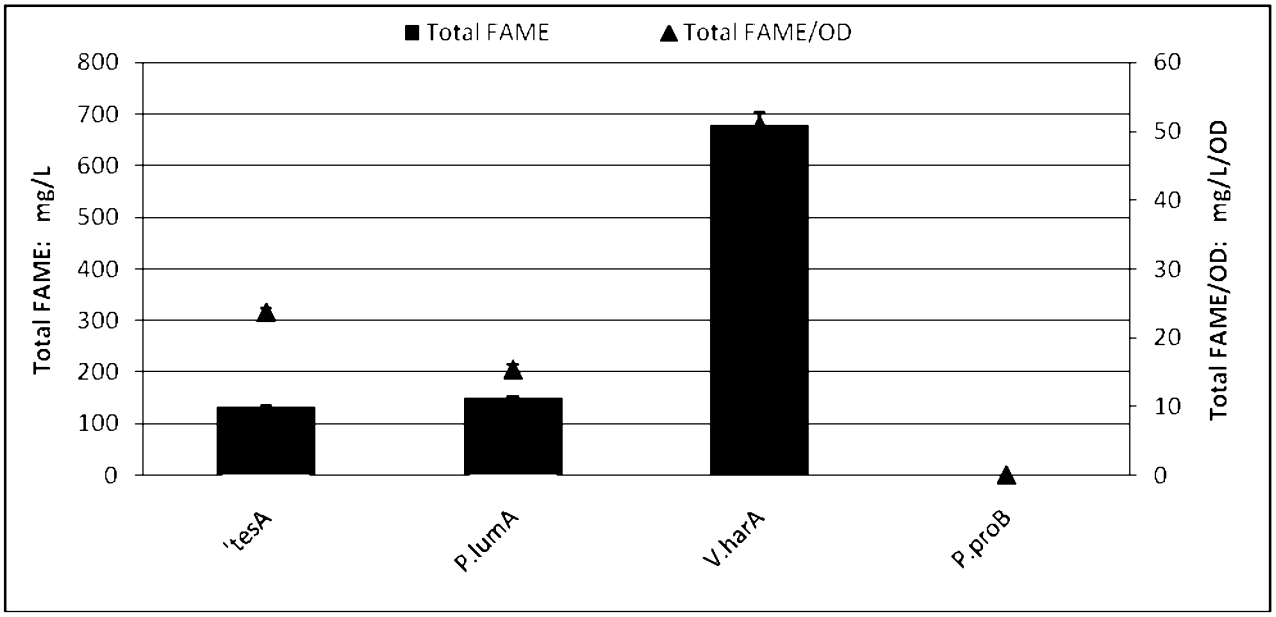


FIGURA 32

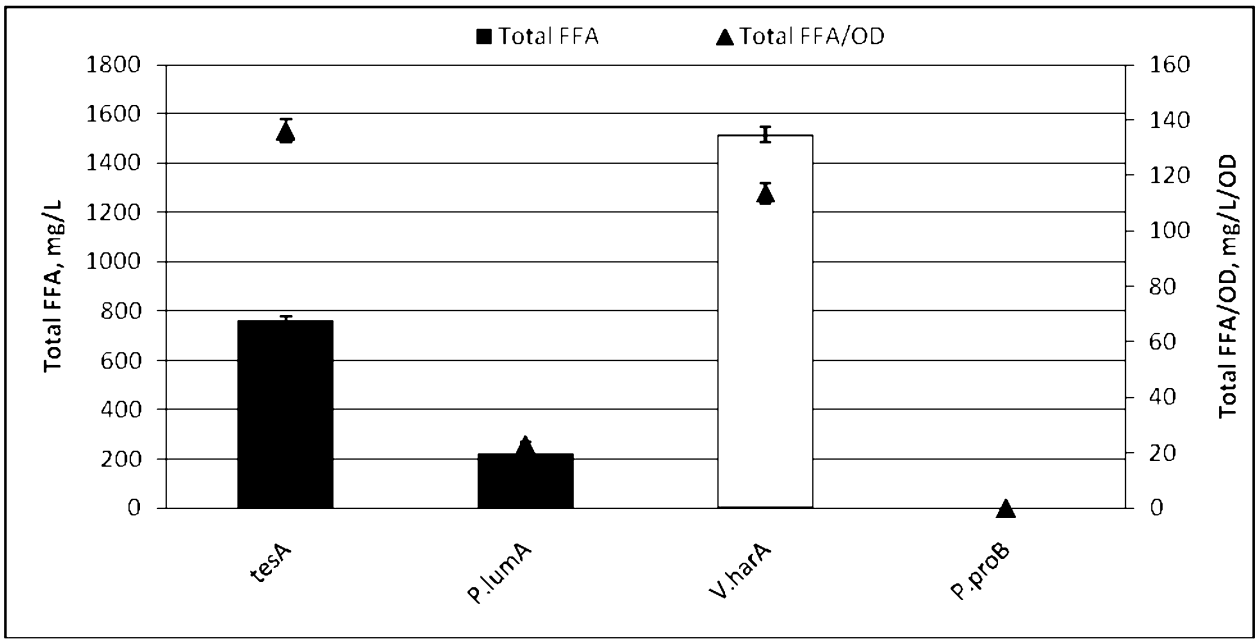

Total FFA
Total FFA/OD
Total FFA, mg/L
Total FFA/OD, mg/L/OD
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
160
140
120
100
80
60
40
20
0
tesA
P.lumA
V.harA
P.proB

FIGURA 33A

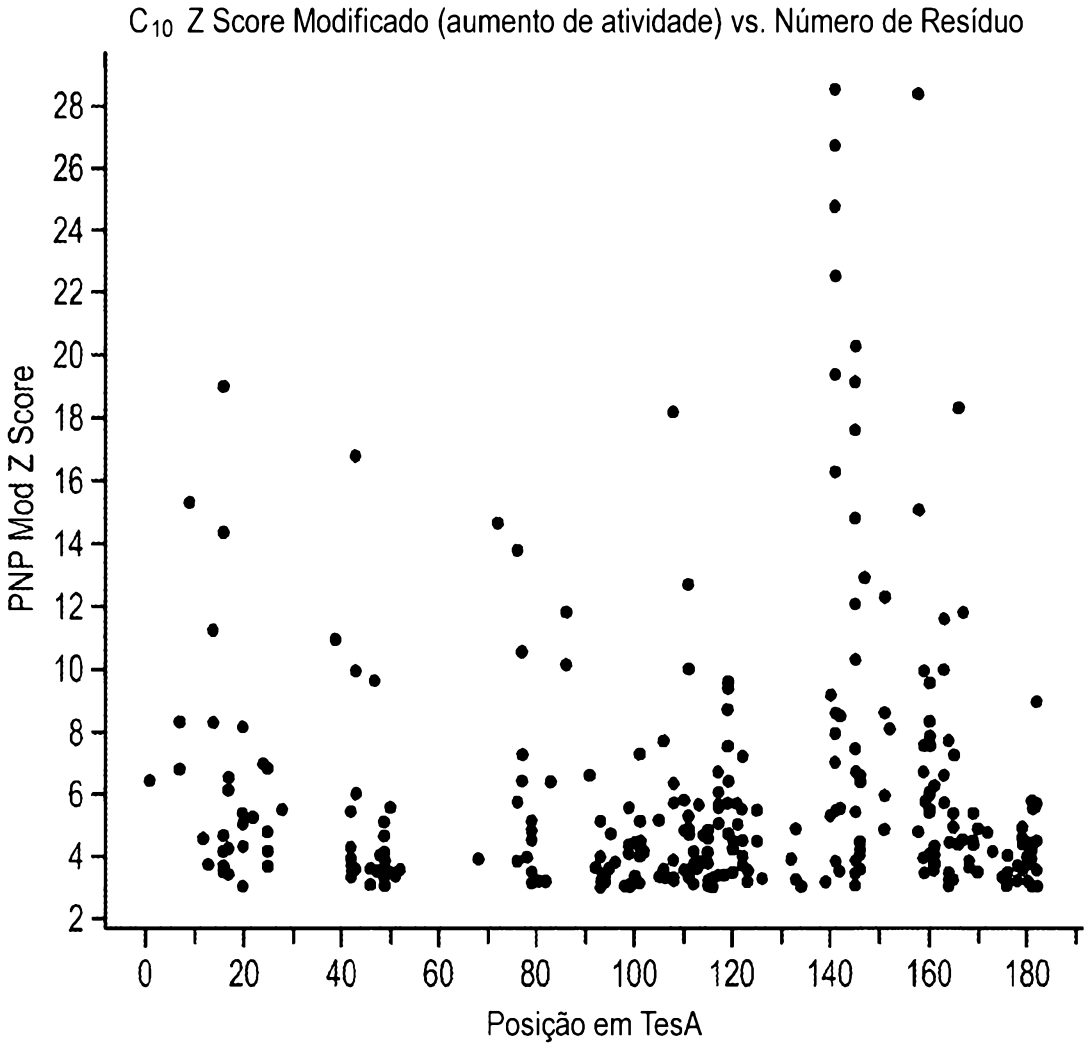

C10 Z Score Modificado (aumento de atividade) vs. Número de Resíduo
PNP Mod Z Score
28
26
24
22
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
Posição em TesA

FIGURA 33B

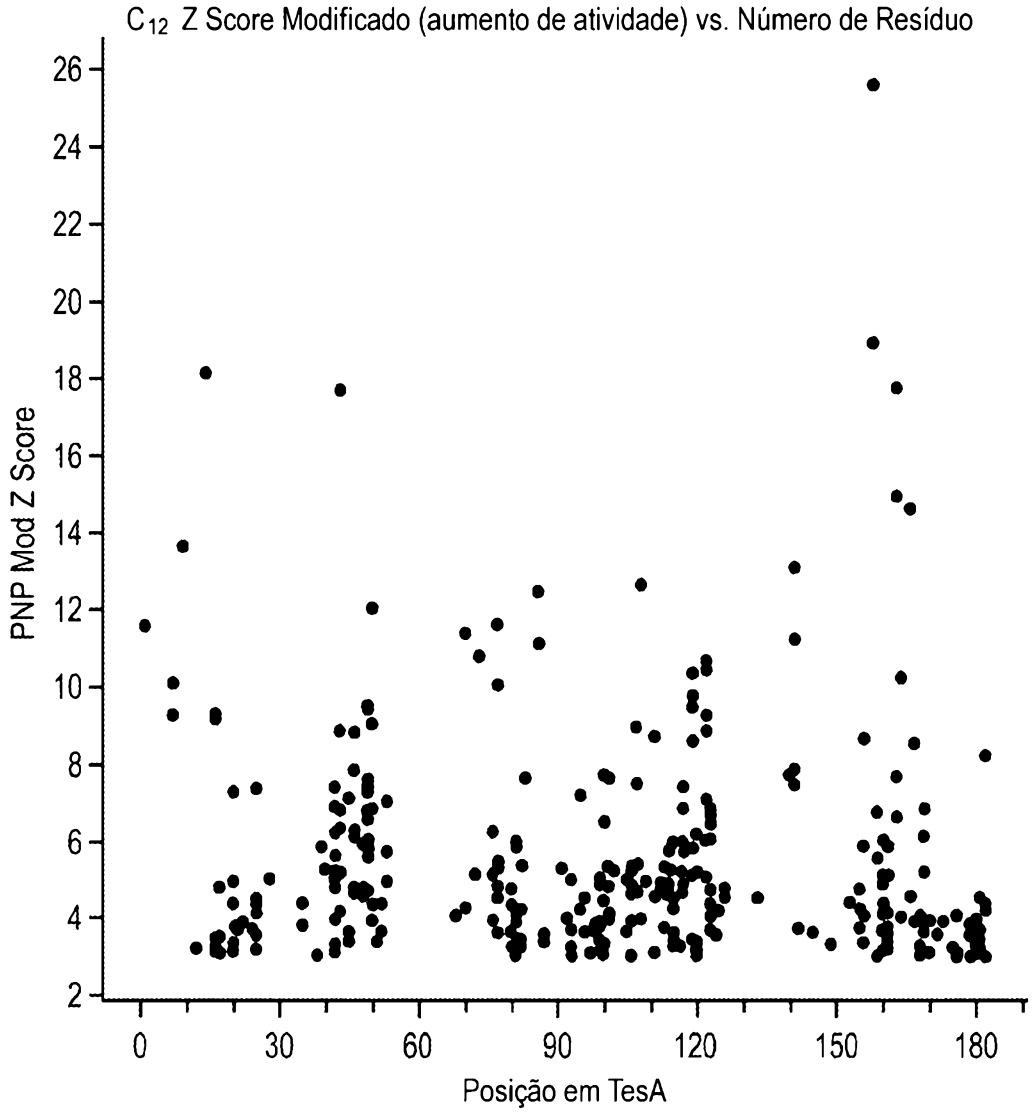

C12 Z Score Modificado (aumento de atividade) vs. Número de Resíduo
PNP Mod Z Score
26
24
22
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
30
60
90
120
150
180
Posição em TesA

FIGURA 33C

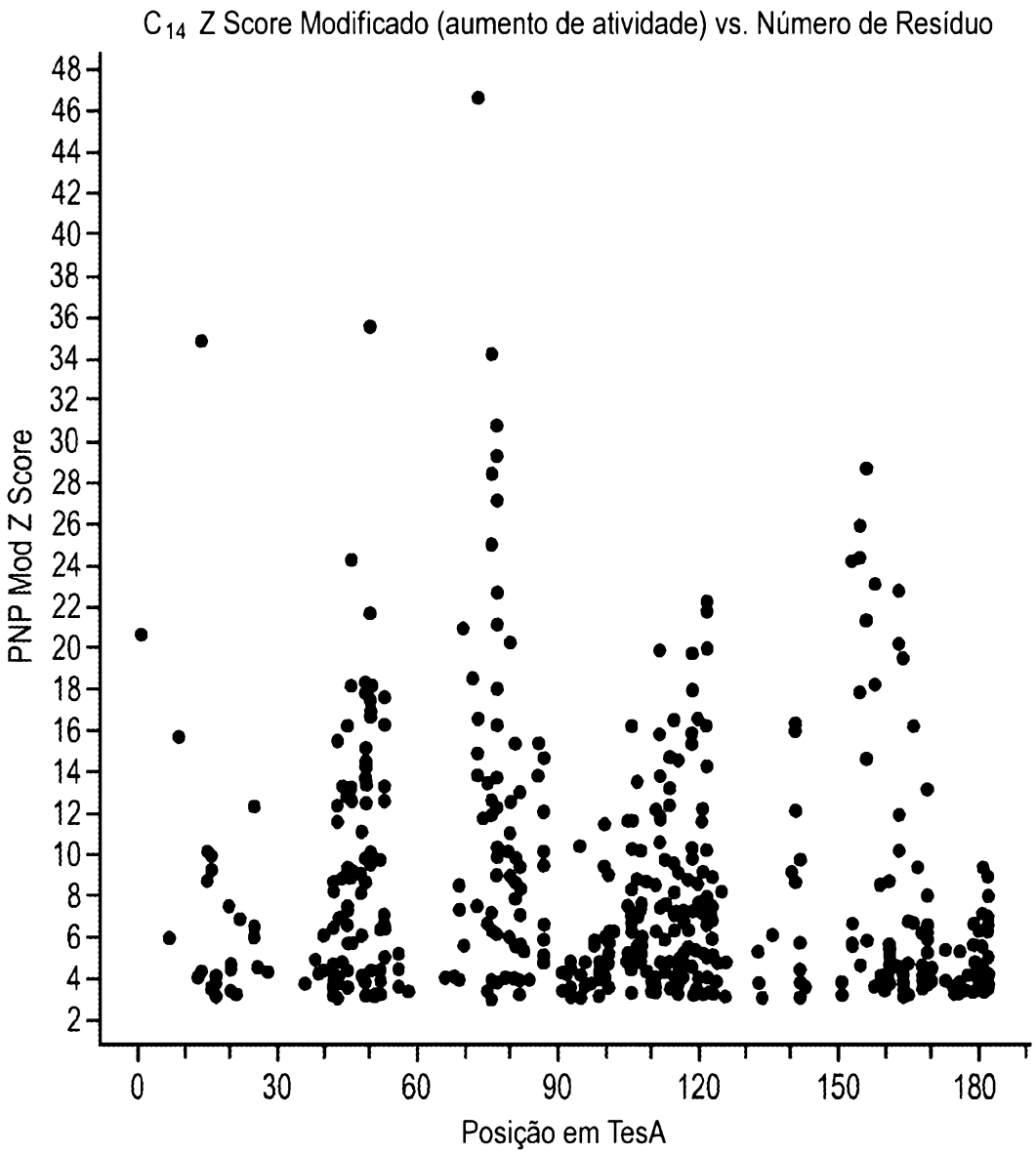

C14 Z Score Modificado (aumento de atividade) vs. Número de Resíduo
PNP Mod Z Score
48
46
44
42
40
38
36
34
32
30
28
26
24
22
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
30
60
90
120
150
180
Posição em TesA

FIGURA 33D

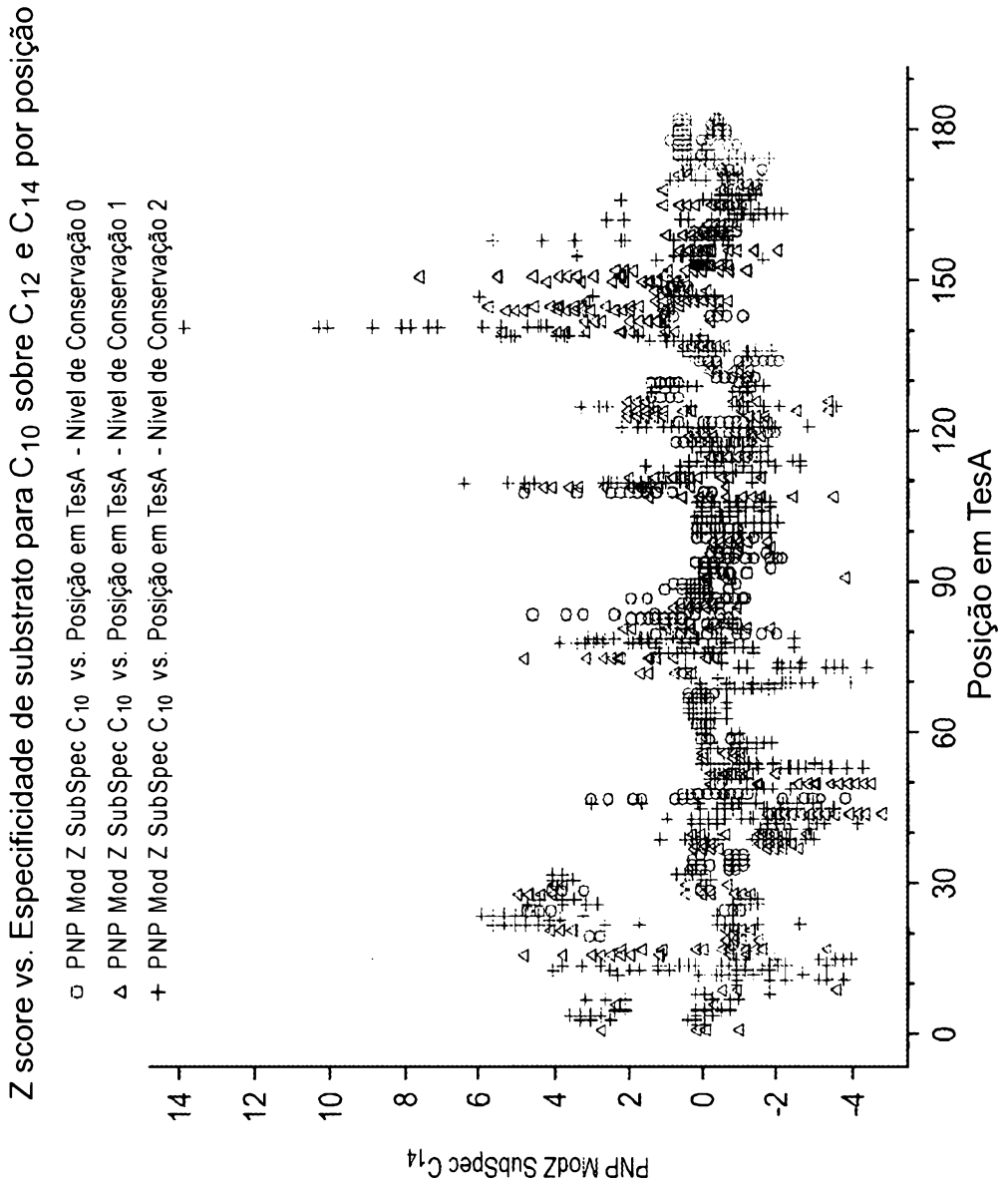

Z score vs. Especificidade de substrato para C_{10} sobre C_{12} e C_{14} por posição
PNP Mod Z SubSpec C_{10} vs. Posição em TesA - Nível de Conservação 0
PNP Mod Z SubSpec C_{10} vs. Posição em TesA - Nível de Conservação 1
PNP Mod Z SubSpec C_{10} vs. Posição em TesA - Nível de Conservação 2
PNP ModZ SubSpec C_{14}
14
12
10
8
6
4
2
0
-2
-4
0
30
60
90
120
150
180
Posição em TesA

FIGURA 33E

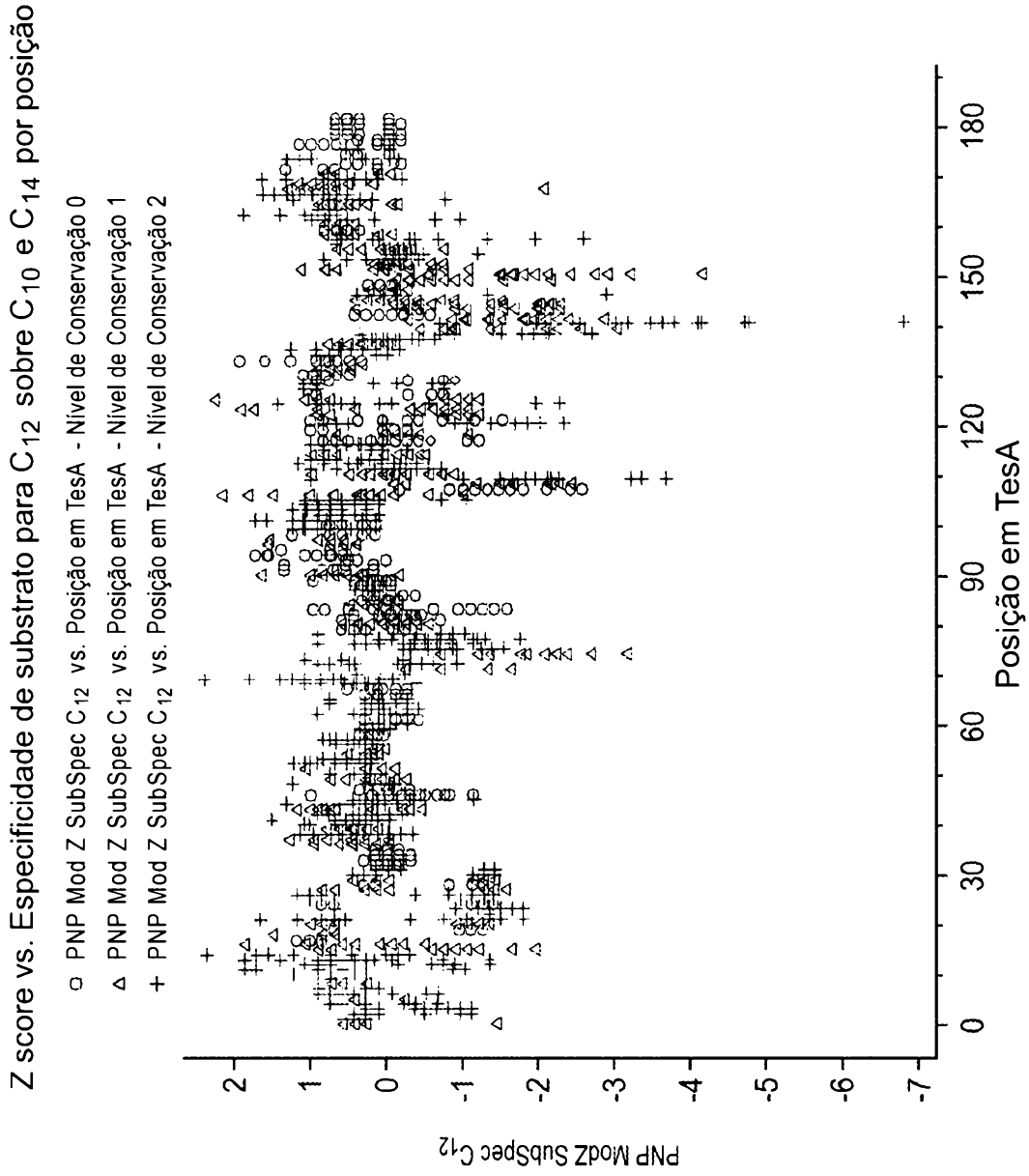

Z score vs. Especificidade de substrato para C12 sobre C10 e C14 por posição
PNP Mod Z SubSpec C12 vs. Posição em TesA - Nível de Conservação 0
PNP Mod Z SubSpec C12 vs. Posição em TesA - Nível de Conservação 1
PNP Mod Z SubSpec C12 vs. Posição em TesA - Nível de Conservação 2
PNP ModZ SubSpec C12
Posição em TesA
2
1
0
-1
-2
-3
-4
-5
-6
-7
0
30
60
90
120
150
180

FIGURA 33F

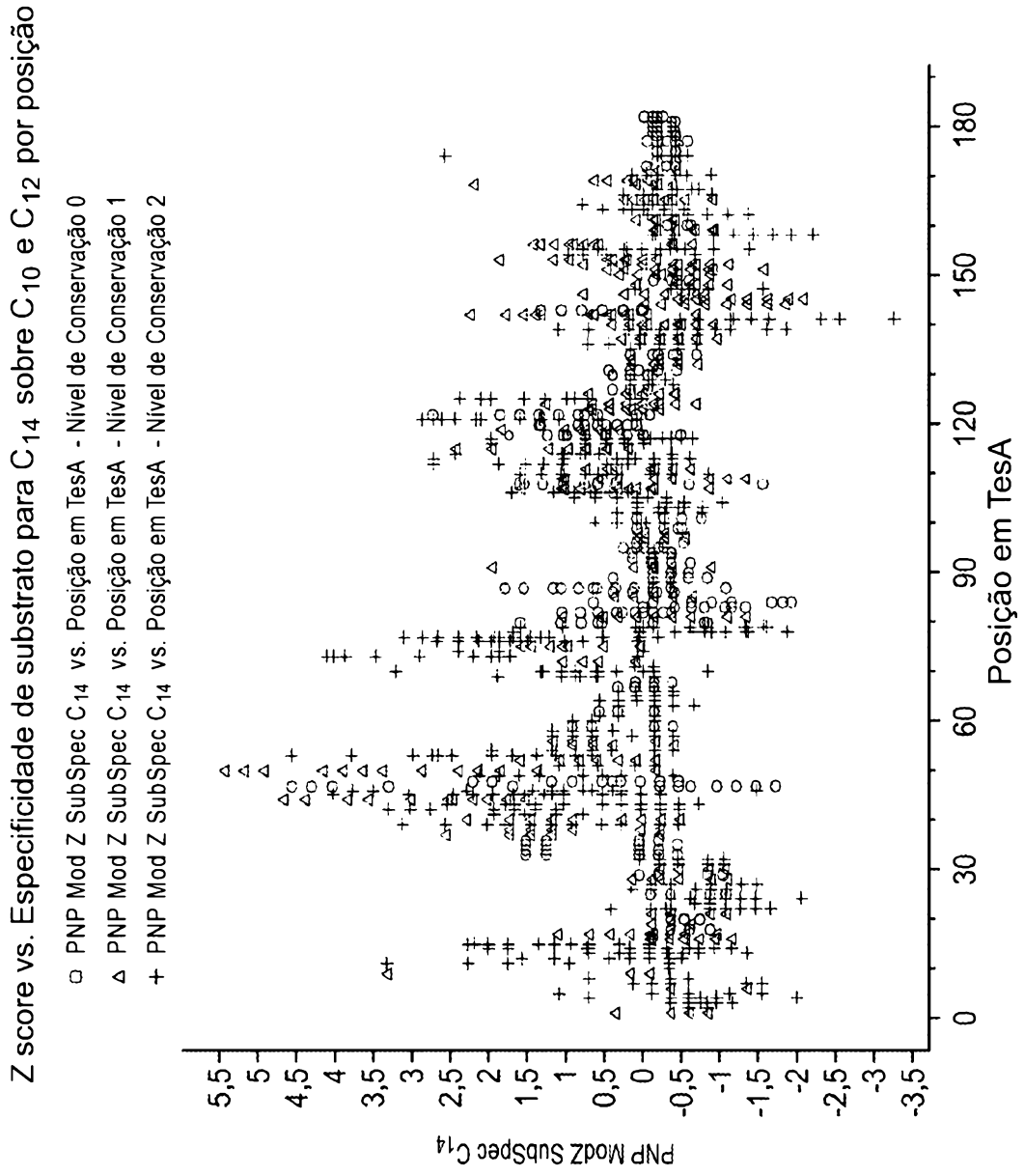

Z score vs. Especificidade de substrato para C_{14} sobre C_{10} e C_{12} por posição
PNP Mod Z SubSpec C_{14} vs. Posição em TesA - Nível de Conservação 0
PNP Mod Z SubSpec C_{14} vs. Posição em TesA - Nível de Conservação 1
PNP Mod Z SubSpec C_{14} vs. Posição em TesA - Nível de Conservação 2
PNP ModZ SubSpec C_{14}
5,5
5
4,5
4
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
-0,5
-1
-1,5
-2
-2,5
-3
-3,5
0
30
60
90
120
150
180
Posição em TesA

FIGURA 34

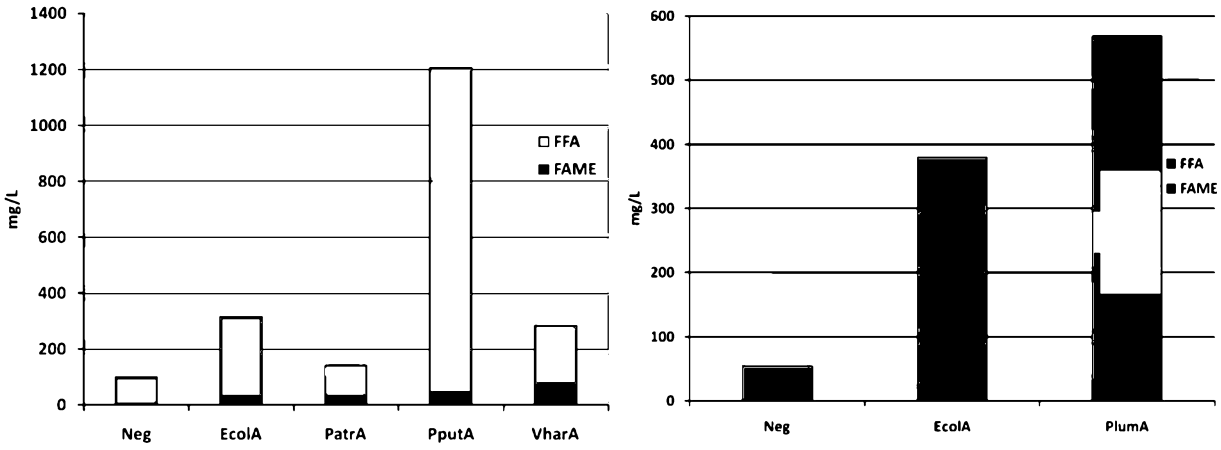

1400
1200
1000
800
600
400
200
0
mg/L
FFA
FAME
Neg
EcolA
PatrA
PputA
VharA
600
500
400
300
200
100
0
mg/L
FFA
FAME
Neg
EcolA
PlumA

FIGURA 35

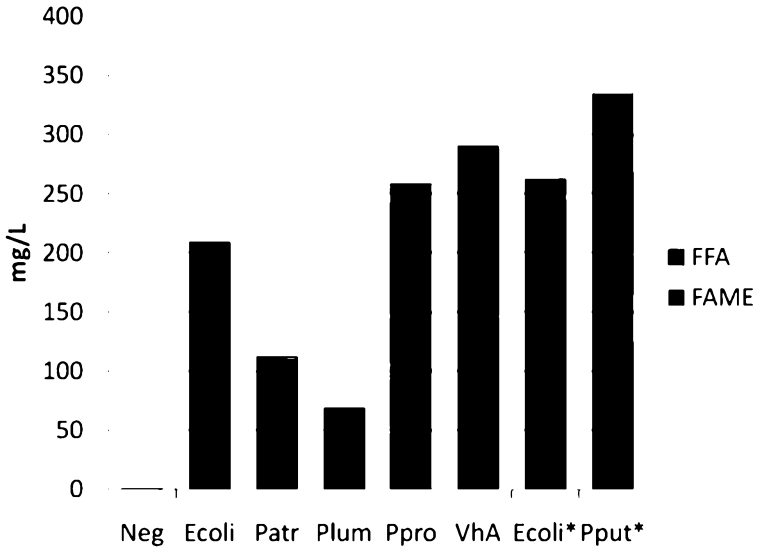


FIGURA 36

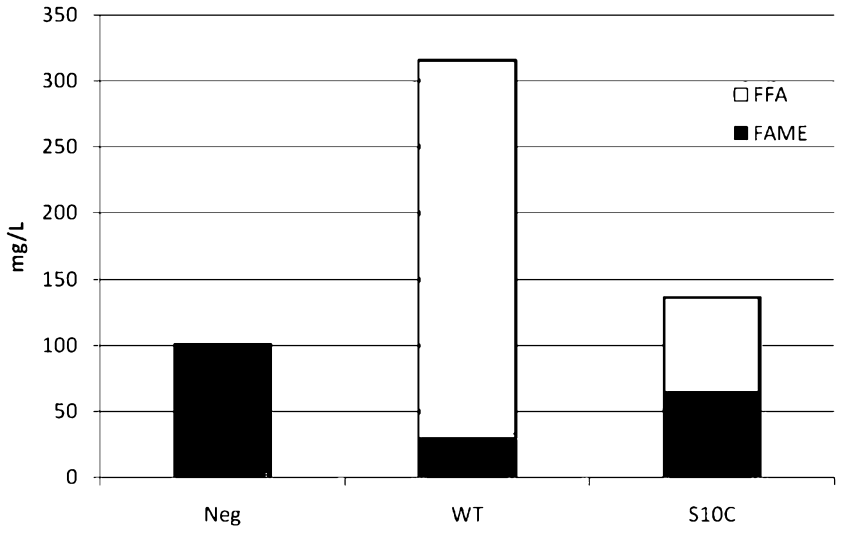


FIGURA 37

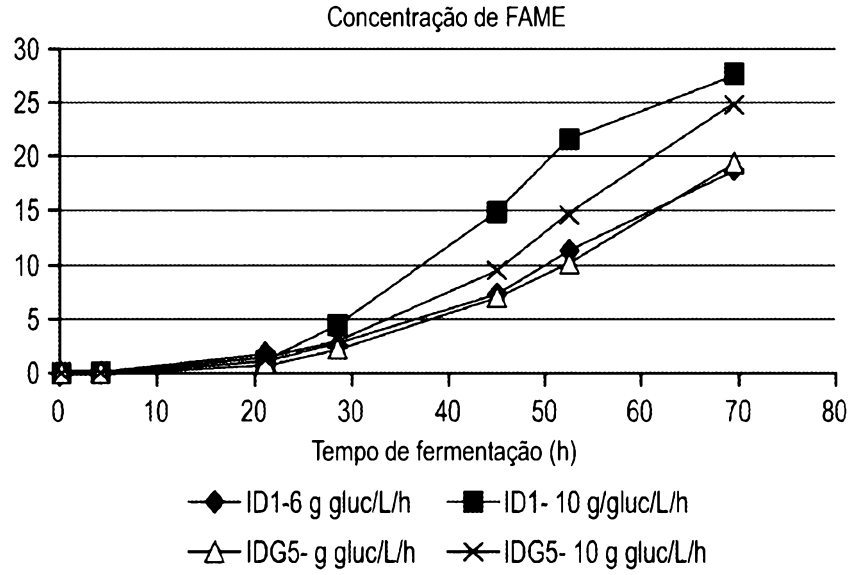


FIGURA 38

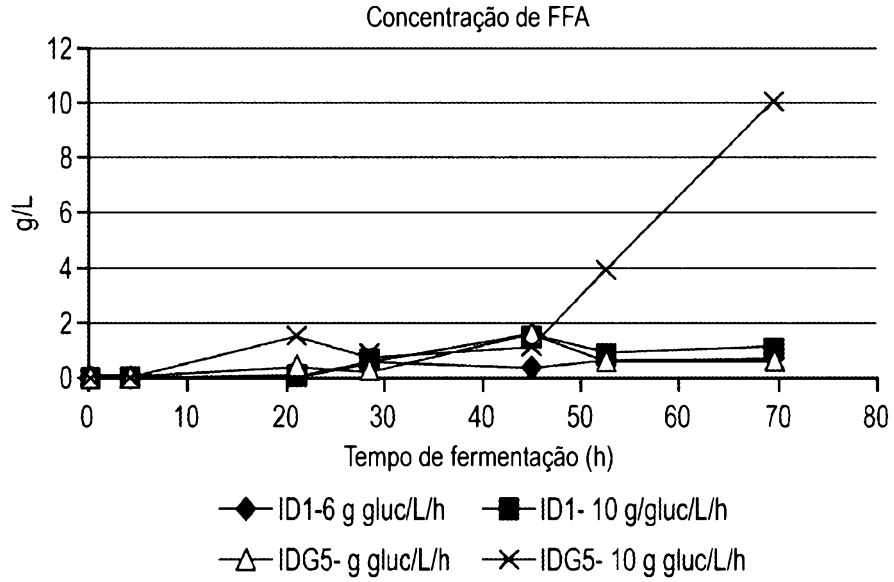


FIGURA 39A

Números de acesso são do NCBI, GenBank, Release 159.0 a partir de março de 2008
Números EC são do KEGG, Release 42.0 a partir de abril de 2007 (mais atualizações diárias até março de 2008)

CATEGORIA	GENE	NOME	ACESSO	NÚMERO EC	MODIFICAÇÃO	USO	ORGANISMO
I. Aumento na Produção de Ácido Graxo/Aumento na Produção de Produto							
aumenta acil-CoA							
reduz catabolismo de derivados e intermediários							
reduz inibição por retroalimentação							
alterna outras vias que consomem ácidos graxos							
	accA	Acetil-CoA carboxilase, subunidade A (carboxiltransferase alfa)	AAC73296, NP_414727	6.4.1.2	Super-expressa	aumenta a produção de Malonil-CoA	*Escherichia coli, Lactococci*
	accB	Acetil-CoA carboxilase, subunidade B (BCCP: proteína transportadora de biotina carboxilada)	NP_417721	6.4.1.2	Super-expressa	aumenta a produção de Malonil-CoA	*Escherichia coli, Lactococci*
	accC	Acetil-CoA carboxilase, subunidade C (biotina carboxilase)	NP_417722	6.4.1.2, 6.3.4.14	Super-expressa	aumenta a produção de Malonil-CoA	*Escherichia coli, Lactococci*
	accD	Acetil-CoA carboxilase, subunidade D (carboxiltransferase beta)	NP_416819	6.4.1.2	Super-expressa	aumenta a produção de Malonil-CoA	*Escherichia coli, Lactococci*
	aceE	piruvato desidrogenase, subunidade E1	NP_414656, AAC73226	1.2.4.1	Super-expressa	aumenta a produção de Acetil-CoA	*Escherichia coli*
	aceF	piruvato desidrogenase, subunidade E2	NP_414657	2.3.1.12	Super-expressa	aumenta a produção de Acetil-CoA	*Escherichia coli*
	ackA	Acetato quinase	AAC75356, NP_416799	2.7.2.1	Deleta ou reduz	aumenta a produção de Acetil-CoA	*Escherichia coli*

FIGURA 39B

CATEGORIA	GENE	NOME	ACESSO	NÚMERO EC	MODIFICAÇÃO	USO	ORGANISMO
	ackB	acetato quinase AckB	BAB81430	2.7.2.1	Deleta ou reduz	aumenta a produção de Acetil-CoA	*Escherichia coli*
	acpP	proteína transportadora de acila	AAC74178	NENHUM	Super-expressa	aumenta a produção de Acetil-CoA	*Escherichia coli*
	fadD	acil-CoA sintase	AP_002424	2.3.1.86, 6.2.1.3	Super-expressa	aumenta a produção de ácido graxo	*Escherichia coli W3110*
	adhE	álcool desidrogenase	CAA47743	1.1.1.1, 1.2.1.10	Deleta ou reduz	aumenta a produção de Acetil-CoA	*Escherichia coli W3111*
	cer1	Aldeído descarboxilase	BAA11024	4.1.99.5	Super-expressa	aumenta a produção de Acetil-CoA	*Arabidopsis thaliana*
	fabA	beta-hidroxidecanoil tioester desidrase	NP_415474	4.2.1.60	expressa	Produção de acil-CoA graxo	*E. coli K12*
	fabD	[proteína transportadora de acila] S-maloniltransferase	AAC74176	2.3.1.39	Super-expressa	aumenta a produção de Acetil-CoA	*E. coli K12*
	fabF	3-oxoacil-[proteína transportadora de acila] sintase II	AAC74179	2.3.1.179	Deleta ou Super-expressa	aumenta a produção de Acetil-CoA	*E. coli K12*
	fabG	3-oxoacil-[proteína transportadora de acila] redutase	AAC74177	1.1.1.100	Super-expressa	aumenta a produção de Acetil-CoA	*E. coli K12*
	fabH	3-oxoacil-[proteína transportadora de acila] sintase III	AAC74175	2.3.1.180	Super-expressa	aumenta a produção de Acetil-CoA	*E. coli K12, lactococci*
	fabI	enoil-[proteína transportadora de acila] redutase, dependente de NADH	NP_415804	1.3.1.9	expressa	Produção de Acil-CoA graxo	*E. coli K12, lactococci*
	fabR	Repressor transcricional	NP_418398	NENHUM	Deleta ou reduz	modula produção de ácido graxo insaturado	*E. coli K12*
	fabZ	(3R)-hidroximiristol proteína transportadora de acila desidratase	NP_414722	4.2.1.-			*E. coli K12*

FIGURA 39C

CATEGORIA	GENE	NOME	ACESSO	NÚMERO EC	MODIFICAÇÃO	USO	ORGANISMO
	fadE	acil-CoA desidrogenase	AAC73325	1.3.99.3, 1.3.99.-	Deleta ou reduz	aumenta a produção de Acetil-CoA	
	acr1	Acil-CoA graxo redutase	YP_047869, AAC45217	1.2.1.42	Super-expressa	Para a produção de álcool graxo	*Acinetobacter sp., i.e. calcoaceticus*
	GSH, gshB	Glutationa sintase	P04425	6.3.2.3	Deleta ou reduz	aumenta Acyl-CoA	*E. coli K12*
	gpsA	sn-glicerol 3-fosfato desidrogenase biossintética	AAC76632, NP_418065	EC: 1.1.1.94	Deleta ou reduz	aumenta a produção de Acetil-CoA	*E. coli K12*
	ldhA	lactato desidrogenase	AAC74462, NP_415898	EC: 1.1.1.27, 1.1.1.28	Deleta ou reduz	aumenta a produção de Acetil-CoA	*E. coli K12*
	Lipase	Triglicerídeo Lipase	CAA89087, CAA98876	3.1.1.3	expressa	aumenta a produção de ácido graxo	*Saccharomyces cerevisiae*
		Malonil-CoA descarboxilase	AAA26500	4.1.1.9, 4.1.1.41	Super-expressa		*Saccharopolyspora erythraea*
	panD	aspartato 1-decarboxilase	BAB96708	4.1.1.11	Super-expressa	Aumenta Acil-CoA	*Escherichia coli W3110*
	panK a.k.a. coaA	pantotenato quinase	AAC76952	2.7.1.33	Super-expressa	aumenta a produção de Acetil-CoA	*E. coli*
	panK a.k.a. coaA, R106K	pantotenato quinase	AAC76952	2.7.1.33	Expressa, Super-expressa, mutação R106K	aumenta a produção de Acetil-CoA	*E. coli*
	pdh	Piruvato desidrogenase	BAB34380, AAC73226, NP_415392	1.2.4.1	Super-expressa	aumenta a produção de Acetil-CoA	
	ptlB	formiato acetiltransferase (piruvato formiato liase)	AAC73989, P09373	EC: 2.3.1.54	Deleta ou reduz	aumenta a produção de Acetil-CoA	
	plsB	aciltransferase	AAC77011	2.3.1.15	Mutação D311E	reduz limites no conjunto Acyl-CoA	*E. coli K12*
	poxB	piruvato oxidase	AAC73958, NP_415392	1.2.2.2	Deleta ou reduz	aumenta a produção de Acetil-CoA	

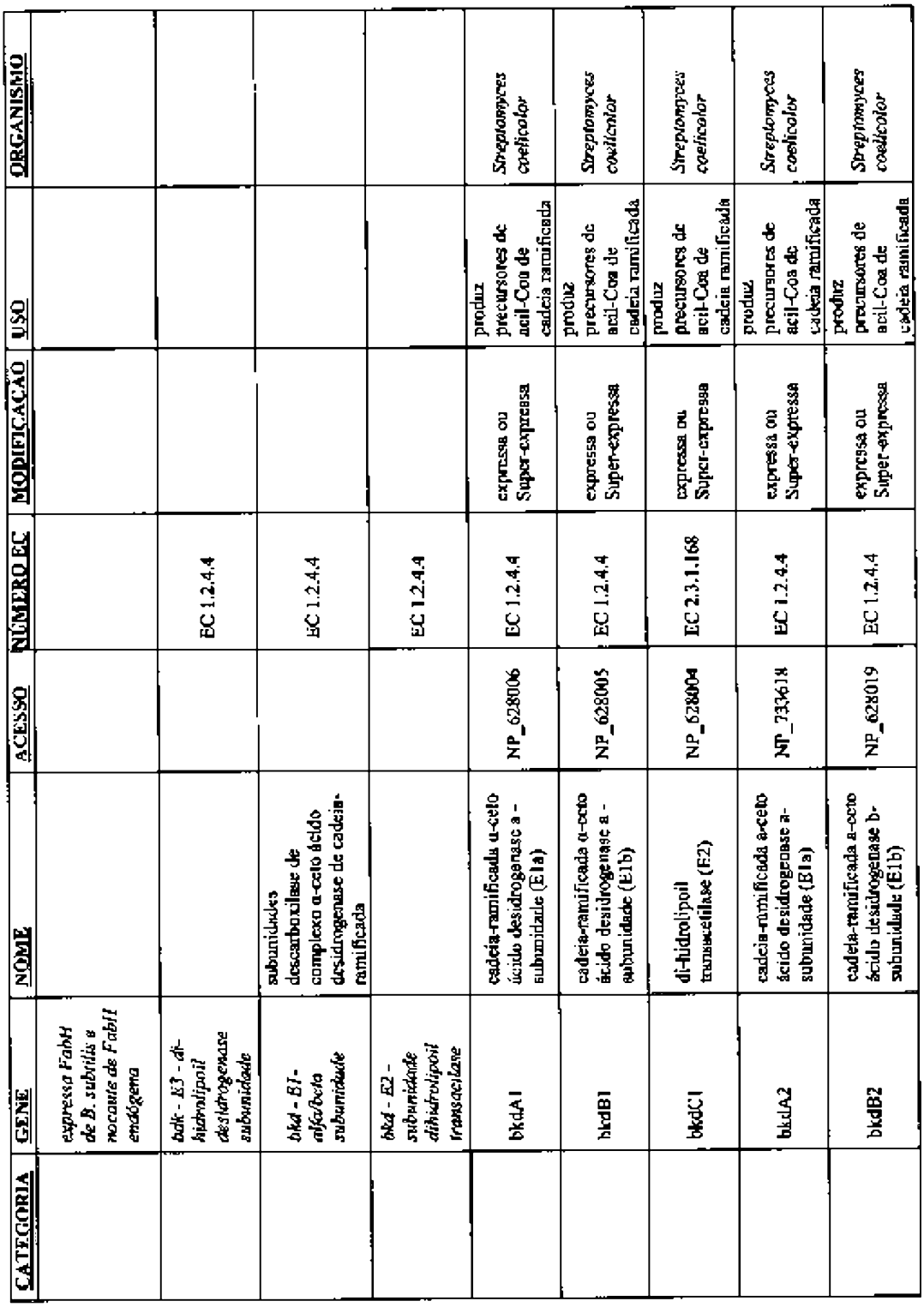
FIGURA 39D

CATEGORIA	GENE	NOME	ACESSO	NÚMERO EC	MODIFICAÇÃO	USO	ORGANISMO
	pta	fosfotransacetilase	AAC75357, NP_416800	2.3.1.8	Deleta ou reduz	aumenta a produção de Acetil-CoA	
	udhA	piridina nucleotídeo transidrogenase	CAA46822	1.6.1.1	Super-expressa	conversão NADH a NADPH ou vice versa	
	fadB	3-hidroxibutiril-CoA epimerase/delta(3)-cis-delta(2)-trans-enoil-CoA isomerase/enoil-CoA hidratase e 3-hidroxiacil-Coa desidrogenase fundidos	AP_003956	4.2.1.17, 5.1.2.3, 5.3.3.8, 1.1.1.35	Deleta ou reduz	Bloqueia a degradação de ácido graxo	*E. coli*
	fadJ	3-hidroxiacil-Coa desidrogenase; K01692 enoil-CoA hidratase; K01782 3-hidroxibutiril-CoA epimerase	AAC75401	1.1.1.35, 4.2.1.17, 5.1.2.3	Deleta ou reduz	Bloqueia a degradação de ácido graxo	*E. coli*
	fadA	3-cetoacil-CoA tiolase	BAE77458	2.3.1.16	Deleta ou reduz	Bloqueia a degradação de ácido graxo	*E. coli*
	fadI	beta-cetoacil-CoA tiolase	AAC75402	2.3.1.16	Deleta ou reduz	Bloqueia a degradação de ácido graxo	*E. coli*
	YdiO	acil-coA desidrogenase	YP_852786	1.3.99.-	Deleta ou reduz	Bloqueia a degradação de ácido graxo	*E. coli*
2. Controle de Estrutura							
2A. Controle de Comprimento de Cadeia							
2	tesA	tioesterase	P0ADA1	3.1.2.-, 3.1.1.5	Deleta e/ou expressa	Comprimento de cadeia C18	
	tesA sem sequencia líder	tioesterase	AAC73596, NP_415027	3.1.2.-, 3.1.1.5	expressa ou super expressa	C18:1	*E.coli*
	tesA sem sequencia líder:L109P	tioesterase	P0ADA1	3.1.2.-, 3.1.1.5	Expressa e/ou super expressa a mutação L109P	Comprimento de cadeia <C18	*E. coli*

FIGURA 39E

CATEGORIA	GENE	NOME	ACESSO	NÚMERO EC	MODIFICAÇÃO	USO	ORGANISMO
	fatB1 (umbellularia)	tioesterase	Q41635	3.1.2.14	expressa ou super-expressa	C12:0	*Umbellularia californica*
	fatB2 (umbellularia)DELETE umbelluria)	tioesterase	AAC49269	3.1.2.14	expressa ou super-expressa	C8:0 - C10:0	*Cuphea hookeriana*
	fatB3	tioesterase	AAC72881	3.1.2.14	expressa ou super-expressa	C14.0 - C16:0	*Cuphea hookeriana*
	fatB (cinnamomum)	tioesterase	Q39473	3.1.2.14	expressa ou super-expressa	C14:0	*Cinnamomum camphora*
	fatB[M141T]*	tioesterase	CAA85388	3.1.2.14	expressa ou super-expressa	C16:1	*Arabidopsis thaliana*
	fatA1 (Helianthus)	tioesterase	AAL79361	3.1.2.14	expressa ou super-expressa	*C18:1*	*Heltanthus annuus*
	alfata (ARABIDOPSIS FATA ACIL-ACP TIOESTERASE)	tioesterase	NP_189147, NP_193041	3.1.2.14	expressa ou super-expressa	C18:1	*Arabidopsis thaliana*
	fatA	tioesterase	CAC39106	3.1.2.14	expressa ou super-expressa	C18:1	*Brassica juncea*
	fatA (cuphea)	tioesterase	AAC72883	3.1.2.14	expressa ou super-expressa	C18:1	*Cuphea hookeriana*
2B. Controle de Ramificação							
	FabH atenuado						
	expressa FabH de S. glaucescens ou S. coelicolor e nocaute FabH endógena					aumenta derivados de cadeia ramificada de ácidos graxos	

FIGURA 39F



CATEGORIA	GENE	NOME	ACESSO	NÚMERO EC	MODIFICAÇÃO	USO	ORGANISMO
	expressa FabH de B. subtilis e nocauts de FabH endógena						
	bdk - E3 - di-hidrolipoil desidrogenase subunidade			EC 1.2.4.4			
	bkd - E1-alfa/beta subunidade	subunidades descarboxilase de complexo a-ceto ácido desidrogenase de cadeia-ramificada		EC 1.2.4.4			
	bkd - E2 - subunidade dihidrolipoil transacetilase			EC 1.2.4.4			
	bkdA1	cadeia-ramificada a-ceto ácido desidrogenase a - subunidade (E1a)	NP_628006	EC 1.2.4.4	expressa ou Super-expressa	produz precursores de acil-Coa de cadeia ramificada	*Streptomyces coelicolor*
	bkdB1	cadeia-ramificada a-ceto ácido desidrogenase a - subunidade (E1b)	NP_628005	EC 1.2.4.4	expressa ou Super-expressa	produz precursores de acil-Coa de cadeia ramificada	*Streptomyces coelicolor*
	bkdC1	di-hidrolipoil transacetilase (E2)	NP_628004	EC 2.3.1.168	expressa ou Super-expressa	produz precursores de acil-Coa de cadeia ramificada	*Streptomyces coelicolor*
	bkdA2	cadeia-ramificada a-ceto ácido desidrogenase a-subunidade (E1a)	NP_733618	EC 1.2.4.4	expressa ou Super-expressa	produz precursores de acil-Coa de cadeia ramificada	*Streptomyces coelicolor*
	bkdB2	cadeia-ramificada a-ceto ácido desidrogenase b-subunidade (E1b)	NP_628019	EC 1.2.4.4	expressa ou Super-expressa	produz precursores de acil-Coa de cadeia ramificada	*Streptomyces coelicolor*

FIGURA 39G

CATEGORIA	GENE	NOME	ACESSO	NÚMERO EC	MODIFICAÇÃO	USO	ORGANISMO
	bkdC2	di-hidrolipoil transacetilase (E2)	NP_628018	EC 2.3.1.168	expressa ou Super-expressa	produz precursores de acil-Coa de cadeia ramificada	*Streptomyces coelicolor*
	bkdA	cadeia-ramificada a-ceto ácido desidrogenase a-subunidade (E1a)	BAC72074	EC 1.2.4.4	expressa ou Super-expressa	produz precursores de acil-Coa de cadeia ramificada	*Streptomyces avermitilis*
	bkdB	cadeia-ramificada a-ceto ácido desidrogenase b-subunidade (E1b)	BAC72075	EC 1.2.4.4	expressa ou Super-expressa	produz precursores de acil-Coa de cadeia ramificada	*Streptomyces avermitilis*
	bkdC	di-hidrolipoil transacetilase (E2)	BAC72076	EC 2.3.1.168	expressa ou Super-expressa	produz precursores de acil-Coa de cadeia ramificada	*Streptomyces avermitilis*
	bkdF	cadeia-ramificada a-ceto ácido desidrogenase a-subunidade (E1a)	BAC72088	EC 1.2.4.4	expressa ou Super-expressa	produz precursores de acil-Coa de cadeia ramificada	*Streptomyces avermitilis*
	bkdG	cadeia-ramificada a-ceto ácido desidrogenase b-subunidade (E1b)	BAC72089	EC 1.2.4.4	expressa ou Super-expressa	produz precursores de acil-Coa de cadeia ramificada	*Streptomyces avermitilis*
	bkdH	di-hidrolipoil transacetilase (E2)	BAC72090	EC 2.3.1.168	expressa ou Super-expressa	produz precursores de acil-Coa de cadeia ramificada	*Streptomyces avermitilis*
	bkdAA	cadeia-ramificada a-ceto ácido desidrogenase a-subunidade (E1a)	NP_390285	EC 1.2.4.4	expressa ou Super-expressa	produz precursores de acil-Coa de cadeia ramificada	*Bacillus subtilis*
	bkdAB	cadeia-ramificada a-ceto ácido desidrogenase b-subunidade (E1b)	NP_390284	EC 1.2.4.4	expressa ou Super-expressa	produz precursores de acil-Coa de cadeia ramificada	*Bacillus subtilis*
	bkdB	di-hidrolipoil transacetilase (E2)	NP_390283	EC 2.3.1.168	expressa ou Super-expressa	produz precursores de acil-Coa de cadeia ramificada	*Bacillus subtilis*

FIGURA 39H

CATEGORIA	GENE	NOME	ACESSO	NÚMERO EC	MODIFICAÇÃO	USO	ORGANISMO
	bkdA1	cadeia-ramificada a-ceto ácido desidrogenase a-subunidade (E1a)	AAA65614	EC 1.2.4.4	expressa ou Super-expressa	produz precursores de acil-Coa de cadeia ramificada	*Pseudomonas putida*
	bkdA2	cadeia-ramificada a-ceto ácido desidrogenase b-subunidade (E1b)	AAA65615	EC 1.2.4.4	expressa ou Super-expressa	produz precursores de acil-Coa de cadeia ramificada	*Pseudomonas putida*
	bkdC	di-hidrolipoil transacetilase (E2)	AAA65617	EC 2.3.1.168	expressa ou Super-expressa	produz precursores de acil-Coa de cadeia ramificada	*Pseudomonas putida*
	lpd	di-hidrolipoamida desidrogenase (E3)	NP_414658	1.8.1.4	expressa ou Super-expressa	produz precursores de acil-Coa de cadeia ramificada	*Escherichia coli*
	IlvE	cadeia-ramificada aminoácido aminotransferase	YP_026247	2.6.1.42	expressa ou Super-expressa	produz a-ceto ácidos ramificados	*Escherichia coli*
	IlvE	cadeia-ramificada aminoácido aminotransferase	AAF34406	2.6.1.42	expressa ou Super-expressa	produz a-ceto ácidos ramificados	*Lactococcus lactis*
	IlvE	cadeia-ramificada aminoácido aminotransferase	NP_745648	2.6.1.42	expressa ou Super-expressa	produz a-ceto ácidos ramificados	*Pseudomonas putida*
	IlvE	cadeia-ramificada aminoácido aminotransferase	NP_629657	2.6.1.42	expressa ou Super-expressa	produz a-ceto ácidos ramificados	*Streptomyces coelicolor*
	ccr	crotonil-CoA redutase	NP_630556	1.6.5.5,1.1.1.1	expressa ou Super-expressa	Converte crotonil-CoA em butiril-CoA	*Streptomyces coelicolor*
	ccr	crotonil-CoA redutase	AAD53915	1.6.5.5,1.1.1.1	expressa ou Super-expressa	Converte crotonil-CoA em butiril-CoA	*Streptomyces cinnamonensis*
	IcmA, isobutiril-CoA mutase	isobutiril-CoA mutase, subunidade A	NP_629554	5.4.99.2	expressa ou Super-expressa	Converte butiril-CoA em isobutiril-CoA	*Streptomyces coelicolor*

FIGURA 39I

CATEGORIA	GENE	NOME	ACESSO	NÚMERO EC	MODIFICAÇÃO	USO	ORGANISMO
	IcmA, isobutiril-CoA mutase	isobutiril-CoA mutase, subunidade A	AAC08713	5.4.99.2	expressa ou Super-expressa	Converte butiril-CoA em isobutiril-CoA	*Streptomyces cinnamonensis*
	IcmB, isobutiril-CoA mutase	isobutiril-CoA mutase, subunidade B	NP_630904	5.4.99.2	expressa ou Super-expressa	Converte butiril-CoA em isobutiril-CoA	*Streptomyces coelicolor*
	IcmB, isobutiril-CoA mutase	isobutiril-CoA mutase, subunidade B	CAB59633	5.4.99.2	expressa ou Super-expressa	Converte butiril-CoA em isobutiril-CoA	*Streptomyces cinnamonensis*
	genes FabH, ACPs e fabF com especificidade para acil-Coas de cadeia ramificada						
	IlvE	cadeia-ramificada aminoácido aminotransferase	CAC12788	EC2.6.1.42	super expressa	aminoácido de cadeia ramificada aminotransferase	Staphylococcus carnosus
	FabH1	beta-cetoacil-ACP sintase III	NP_626634	2.3.1.180	expressa ou Super-expressa	iniciação da biossíntese de ácido graxo de cadeia ramificada	Streptomyces coelicolor
	ACP	proteína transportadora de acila	NP_626635	NENHUM	expressa ou Super-expressa	iniciação e alongamento da biossíntese de ácido graxo de cadeia ramificada	*Streptomyces coelicolor*
	FabF	beta-cetoacil-ACP sintase II	NP_626636	2.3.1.179	expressa ou Super-expressa	alongamento da biossíntese de ácido graxo de cadeia ramificada	*Streptomyces coelicolor*
	FabH3	beta-cetoacil-ACP sintase III	NP_823466	2.3.1.180	expressa ou Super-expressa	iniciação da biossíntese de ácido graxo de cadeia ramificada	*Streptomyces avermitilis*

FIGURA 39J

CATEGORIA	GENE	NOME	ACESSO	NÚMERO EC	MODIFICAÇÃO	USO	ORGANISMO
	FabC3 (ACP)	proteína transportadora de acila	NP_823467	NENHUM	expressa ou Super-expressa	iniciação e alongamento da biossíntese de ácido graxo de cadeia ramificada	*Streptomyces avermitilis*
	FabF	beta-cetoacil-ACP sintase II	NP_823468	2.3.1.179	expressa ou Super-expressa	alongamento da biossíntese de ácido graxo de cadeia ramificada	*Streptomyces avermitilis*
	FabH_A	beta-cetoacil-ACP sintase III	NP_389015	2.3.1.180	expressa ou Super-expressa	iniciação da biossíntese de ácido graxo de cadeia ramificada	*Bacillus subtillis*
	FabH_B	beta-cetoacil-ACP sintase III	NP_388898	2.3.1.180	expressa ou Super-expressa	iniciação da biosalntese de ácido graxo de cadeia ramificada	*Bacillus subtillis*
	ACP	proteína transportadora de acila	NP_389474	NENHUM	expressa ou Super-expressa	iniciação e alongamento da biossíntese de ácido graxo de cadeia ramificada	*Bacillus subtillis*
	FabF	beta-cetoacil-ACP sintase II	NP_389016	2.3.1.179	expressa ou Super-expressa	alongamento da biossíntese de ácido graxo de cadeia ramificada	*Bacillus subtillis*
	SmalDRAFT_0818	beta-cetoacil-ACP sintase III	ZP_01643059	2.3.1.180	expressa ou Super-expressa	iniciação da biossíntese de ácido graxo de cadeia ramificada	*Stenotrophomonas maltophilia*
	SmalDRAFT_0821	proteína transportadora de acila	ZP_01643063	NENHUM	expressa ou Super-expressa	iniciação e alongamento da biossíntese de ácido graxo de cadeia ramificada	*Stenotrophomonas maltophilia*
	SmalDRAFT_0822	beta-cetoacil-ACP sintase II	ZP_01643064	2.3.1.179	expressa ou Super-expressa	alongamento da biossíntese de ácido graxo de cadeia ramificada	*Stenotrophomonas maltophilia*

FIGURA 39L

CATEGORIA	GENE	NOME	ACESSO	NÚMERO EC	MODIFICAÇÃO	USO	ORGANISMO
	FabH	beta-cetoacil-ACP sintase III	YP_123672	2.3.1.180	expressa ou Super-expressa	iniciação da biossíntese de ácido graxo de cadeia ramificada	*Legionella pneumophila*
	ACP	proteína transportadora de acila	YP_123675	NENHUM	expressa ou Superexpressa	iniciação e alongamento da biossíntese de ácido graxo de cadeia ramificada	*Legionella pneumophila*
	FabF	beta-cetoacil-ACP sintase II	YP_123676	2.3.1.179	expressa ou Super-expressa	alongamento da biossíntese de ácido graxo de cadeia ramificada	*Legionella pneumophila*
	FabH	beta-cetoacil-ACP sintase III	NP_415609	2.3.1.180	Deleta ou reduz	iniciação da biossíntese de ácido graxo de cadeia ramificada	*Escherichia coli*
	FabF	beta-cetoacil-ACP sintase II	NP_415613	2.3.1.179	Deleta ou reduz	alongamento da biossíntese de ácido graxo de cadeia ramificada	*Escherichia coli*
Para produzir ácidos graxos cíclicos							
	AnsJ	desidratase (putativo)	não disponível	não disponível	expressa ou Super-expressa	biossíntese de ciclohexilcarbonil -CoA	*Streptomyces collinus*
	AnsK	CoA ligase (putativo)	não disponível	não disponível	expressa ou Super-expressa	biossíntese de ciclohexilcarbonil -CoA	*Streptomyces collinus*
	AnsL	desidrogenase (putativo)	não disponível	não disponível	expressa ou Super-expressa	biossíntese de ciclohexilcarbonil -CoA	*Streptomyces collinus*
	ChcA	enoil-CoA redutase	U72144	EC 1.3.1.34	expressa ou Super-expressa	biossíntese de ciclohexilcarbonil -CoA	*Streptomyces collinus*
	AnsM	oxidorredutase (putativa)	não disponível	não disponível	expressa ou Super-expressa	biossíntese de ciclohexilcarbonil -CoA	*Streptomyces collinus*
	PlmJ	desidratase (putativo)	AAQ84158	não disponível	expressa ou Super-expressa	biossíntese de ciclohexilcarbonil -CoA	*Streptomyces sp. HK803*

FIGURA 39M

CATEGORIA	GENE	NOME	ACESSO	NÚMERO EC	MODIFICAÇÃO	USO	ORGANISMO
	PlmK	CoA ligase (putativo)	AAQ84158	não disponível	expressa ou Super-expressa	biossíntese de ciclohexilcarbonil -CoA	*Streptomyces sp. HK803*
	PlmL	desidrogenase (putativo)	AAQ84159	não disponível	expressa ou Super-expressa	biossíntese de ciclohexilcarbonil -CoA	*Streptomyces sp. HK803*
	ChcA	enoil-CoA redutase	AAQ84160	EC 1.3.1.34	expressa ou Super-expressa	biossíntese de ciclohexilcarbonil -CoA	*Streptomyces sp. HK803*
	PlmM	oxidoredutase (putativa)	AAQ84161	não disponível	expressa ou Super-expressa	biossíntese de ciclohexilcarbonil -CoA	*Streptomyces sp. HK803*
	ChcB	enoil-CoA isomerase	AF268489	não disponível	expressa ou Super-expressa	biossíntese de ciclohexilcarbonil -CoA	*Streptomyces collinus*
	ChcB/CaiD	enoil-CoA isomerase	NP_629292	4.2.1.-	expressa ou Super-expressa	biossíntese de ciclohexilcarbonil -CoA	*Streptomyces coelicolor*
	ChcB/CaiD	enoil-CoA isomerase	NP_824296	4.2.1.-	expressa ou Super-expressa	biossíntese de ciclohexilcarbonil -CoA	*Streptomyces avermitilis*
2C. Controle do nível de saturação							
	Sfa	Supressor de FabA	AAN79592, AAC44390	NENHUM	Superexpressa	aumenta ácidos graxos monoinsaturados	*E.coli*
	Ver também FabA no item 1				expressa	produz ácidos graxos insaturados	
	GnsA	supressores da mutação nula secG	ABD18647.1	NENHUM	Superexpressa	aumenta ésteres de ácidos graxos insaturados	*E.coli*
	GnsB	supressores da mutação nula secG	AAC74076.1	NENHUM	Superexpressa	aumenta ésteres de ácidos graxos insaturados	*E.coli*

FIGURA 39N

CATEGORIA	GENE	NOME	ACESSO	NÚMERO EC	MODIFICAÇÃO	USO	ORGANISMO
	também *ver* seção 2A - itens com :0 até insaturados (sem duplas ligações) e com :1 são saturados (1 dupla ligação)						
	fabB	3-oxoacil-[proteína transportadora de acila] sintase I	BAA16180	EC:2.3.1.41	super-expressa	modula produção de ácido graxo insaturado	*Escherichia coli*
	fabK	trans-2-enoil-ACP redutase II	AAF98273	1.3.1.9	expressa	modula produção de ácido graxo insaturado	*Streptococcus pneumoniae*
	fabL	enoil-(proteína transportadora de acila) redutase	AAU39821	1.3.1.9	expressa	modula produção de ácido graxo insaturado	*Bacillus licheniformis DSM 13*
	fabM	trans-2, cis-3-decenoil-ACP isomerase	DAA05501	4.2.1.17	Superexpressa	modula produção de ácido graxo insaturado	*Streptococcus mutans*
Produção de aldeído graxo							
	tioesterase	*ver* seção de controle de comprimento de cadeia			expressa	produce	
Exportação							
	Exportador cera éster (família FATP, proteína transportadora de ácido graxo (cadeia longa))		NP_524723	NENHUM	expressa	Exporta cera	*Drosophila melanogaster*
	proteína transportadora ABC	transportadora de alcanos putativa	AAN73268	NENHUM	expressa	exporta produtos	*Rhodococcus erythropolis*

FIGURA 39O

CATEGORIA	GENE	NOME	ACESSO	NÚMERO EC	MODIFICAÇÃO	USO	ORGANISMO
	CER5	transportadora de cera	At1g51500, AY734542, At3g21090, At1g51460	NENHUM	expressa	exporta produtos	*Arabidopsis thaliana*
	AtMRP5	Associada a resistência multidrogas em *Arabidopsis thaliana*	NP_171908	NENHUM	expressa	exporta produtos	*Arabidopsis thaliana*
	AmiS2	AmiS2 transportadora de ABC	JC5491	NENHUM	expressa	exporta produtos	*Rhodococcus sp.*
	AtPGP1	P GLICOPROTEÍNA1 de *Arabidopsis thaliana*	NP_181228	NENHUM	expressa	exporta produtos	*Arabidopsis thaliana*
	AcrA	proteína putativa transportadora multidrogas-efluxo acrA	CAF23274	NENHUM	expressa	exporta produtos	*Candidatus Protochlamydia amoebophila UWE25*
	AcrB	provável proteína transportadora multidrogas-efluxo, acrB	CAF23275	NENHUM	expressa	exporta produtos	*Candidatus Protochlamydia amoebophila UWE25*
	TolC	Proteína da membrana externa [biogênese do envelope celular.	ABD59001	NENHUM	expressa	exporta produtos	*Francisella tularensis subsp. novicida*
	AcrE	proteína transmembrana afeta formação de septo e permeabilidade da membrana celular	YP_312213	NENHUM	expressa	exporta produtos	*Shigella sonnei Ss046*
	AcrF	proteína de resistência a acriflavina F	P24181	NENHUM	expressa	exporta produtos	*Escherichia coli*
	tll1618	transportadora efluxo de multidrogas	NP_682408.1	NENHUM	expressa	exporta produtos	*Thermosynechococcus elongatus BP-1]*
	tll1619	transportadora efluxo de multidrogas	NP_682409.1	NENHUM	expressa	exporta produtos	*Thermosynechococcus elongatus BP-1]*
	tll0139	transportadora efluxo de multidrogas	NP_680930.1	NENHUM	expressa	exporta produtos	*Thermosynechococcus elongatus BP-1]*

FIGURA 39P

CATEGORIA	GENE	NOME	ACESSO	NÚMERO EC	MODIFICAÇÃO	USO	ORGANISMO
5. Fermentação							
	genes *checkpoint* de replicação					aumenta eficiência de produção	
	umuD	DNA polimerase V, subunidade	YP_310132	3.4.21.-	Superexpressa	aumenta eficiência de produção	*Shigella sonnei Ss046*
	umuC	DNA polimerase V, subunidade	ABC42261	2.7.7.7	Superexpressa	aumenta eficiência de produção	*Escherichia coli*
	NADH:NADPH transidrogenase (subunidades alfa e beta) (pntA, pntB)		P07001, P0AB70	1.6.1.2	expressa	aumenta eficiência de produção	*Shigella flexneri*

FIGURA 40

Motivo 1

-G-Y-X-X-S/A/T-K-W/L (SEQ ID NO:17); e

-G-X-X-G-X-L-G (SEQ ID NO:18); e

-L/V/I-G-G-D-S-X-X-A (SEQ ID NO:19); e

-[LIVMFY]-{E}-{VES}-[STG]-[STAG]-G-[ST]-[STEIA]-[SG]-X-[PA$LIVM]-[KR] (SEQ ID NO:20), onde {X} significa qualquer aminoácido exceto X e $[X_1X_2]$ significa X_1 ou X_2

Motivo 2

RTVLLX$_1$GAX$_2$GX$_3$LGRX$_4$LX$_5$LX$_6$WL (SEQ ID NO:21)

onde X_1 é S ou T;

X_2 é T ou N;

X_3 é F ou W;

X_4 é F ou Y;

X_5 é A ou T; e

X_6 é E ou Q

Motivo 3

LXXGXXGXLGXXLXLXWLXR (SEQ ID NO:22)

Motivo 4

WAXEVLLR (SEQ ID NO:23), onde X pode ser qualquer aminoácido; ou

LXXGXXGXLGXXLXX$_1$XX$_2$LX$_3$R (SEQ ID NO:24), onde

X_1 é Leu ou Ile;

X_2 é Trp ou Leu; e

X_3 varia entre 13 aminoácidos ou 14 aminoácidos

Motivo 5

-G-Y-X-X-S/A/T-K-W/L (SEQ ID NO:17); e

-L/V/I-G-G-D-S-X-X-A (SEQ ID NO:19); e

-[LIVMFY]-{E}-{VES}-[STG]-[STAG]-G-[ST]-[STEIA]-[SG]-X-{PA$LIVM]-[KR] (SEQ ID NO:20), onde {X} significa qualquer aminoácido exceto X e $[X_1X_2]$ significa X_1 ou X_2; and

RTVLLX$_1$GAX$_2$GX$_3$LGRX$_4$LX$_5$LX$_6$WL (SEQ ID NO:21), onde

X_1 é S ou T;

X_2 é T ou N;

X_3 é F ou W;

X_4 é F ou Y;

X_5 é A ou T; e

X_6 é E ou Q

FIGURA 41

G-D-S-L-X(5)-M(SEQ ID NO:28), onde:

O resíduo Ser na posição 3 é um resíduo catalítico;
O resíduo Asp na posição 2 pode ser substituído por Asn ou Thr;
O resíduo Leu na posição 4 pode ser substituído por Cys ou Gln;
O resíduo Met na posição 6 pode ser substituído por Cys, Asp, Leu, Asn, Thr, ou Val;

E

V-X(2)-G-X-N-D-X-L (SEQ ID NO:29), onde:

O resíduo Asn na posição 5 está no buraco oxiânion;
O resíduo Val na posição 1 pode ser substituído por Leu;
O resíduo Asn na posição 5 pode ser substituído por Val, Leu, Cys, Ala, Gly, His, Ile, Thr ou Trp;
O resíduo Asp na posição 6 pode ser substituído por Glu;
O resíduo Leu na posição 8 pode ser substituído por Ile, Trp, Phe, Thr, Met, Ala, Glu, Asn ou Val;

E

D-X(2)-H-P-X(7)-I (SEQ ID NO:30), onde:

Os resíduos Asp e His nas posições 1 e 4, respectivamente, são os resíduos catalíticos;
O resíduo Pro na posição 5 pode ser substituído por Gly, Ala, Phe, Leu, Ser ou Val;
O resíduo Ile na posição 13 pode ser substituído por Leu ou Val.

FIGURA 42A

POSIÇÃO	MUTAÇÃO	PNP Mouse-Mo	PNP Mouse-Cp	PNP Mouse-Cp
1	A1S	[illegible]	[illegible]	[illegible]
7	L7M	[illegible]	[illegible]	[illegible]
7	L7V	[illegible]	[illegible]	2.303
9	D9N	[illegible]	[illegible]	[illegible]
12	S12A	[illegible]	[illegible]	1.903
13	A13D	[illegible]	0.903	-0.729
13	A13V	1.335	2.360	[illegible]
14	G14S	[illegible]	2.097	0.756
14	G14T	-1.567	0.967	[illegible]
14	G14V	[illegible]	[illegible]	[illegible]
15	Y15E	-4.756	2.142	[illegible]
15	Y15V	-7.702	-0.520	[illegible]
16	R16G	[illegible]	[illegible]	[illegible]
16	R16L	[illegible]	[illegible]	2.956
16	R16M	[illegible]	2.753	2.318
16	R16N	[illegible]	[illegible]	[illegible]
16	R16P	[illegible]	[illegible]	[illegible]
16	R16T	[illegible]	[illegible]	1.476
17	M17C	[illegible]	[illegible]	[illegible]
17	M17D	1.338	2.867	[illegible]
17	M17L	[illegible]	2.420	2.893
17	M17N	-0.090	[illegible]	[illegible]
17	M17T	[illegible]	[illegible]	[illegible]
17	M17V	[illegible]	2.281	2.390
20	S20A	[illegible]	[illegible]	[illegible]
20	S20C	[illegible]	[illegible]	2.849
20	S20D	[illegible]	[illegible]	[illegible]
20	S20G	[illegible]	[illegible]	[illegible]
20	S20L	[illegible]	[illegible]	[illegible]
20	S20T	[illegible]	[illegible]	[illegible]
20	S20W	[illegible]	[illegible]	[illegible]
21	A21G	2.006	2.215	[illegible]
21	A21P	2.704	[illegible]	1.674
22	A22N	[illegible]	[illegible]	[illegible]
24	P24V	[illegible]	[illegible]	2.463
25	A25D	2.272	[illegible]	2.194
25	A25E	[illegible]	[illegible]	[illegible]
25	A25L	[illegible]	[illegible]	2.472
25	A25N	[illegible]	[illegible]	[illegible]
25	A25Q	[illegible]	[illegible]	[illegible]
25	A25V	[illegible]	[illegible]	[illegible]
26	L26Q	2.404	2.435	[illegible]
26	L26V	1.964	2.454	[illegible]
28	N28K	1.848	2.279	[illegible]
28	N28R	[illegible]	[illegible]	2.939

FIGURA 42B

Posição	Mutação	[illegible]	[illegible]	[illegible]
35	T35L	1.142	[illegible]	1.387
35	T35Y	1.199	[illegible]	1.851
36	S36H	1.023	1.356	[illegible]
38	V38F	2.942	[illegible]	[illegible]
39	N39A	[illegible]	[illegible]	2.829
39	N39Q	-4.841	0.211	[illegible]
40	A40G	1.657	1.721	[illegible]
40	A40V	1.830	[illegible]	[illegible]
42	I42A	[illegible]	[illegible]	[illegible]
42	I42C	2.384	[illegible]	1.925
42	I42D	-2.516	[illegible]	[illegible]
42	I42E	[illegible]	[illegible]	[illegible]
42	I42G	0.206	[illegible]	[illegible]
42	I42L	[illegible]	[illegible]	[illegible]
42	I42M	2.715	[illegible]	[illegible]
42	I42S	[illegible]	[illegible]	[illegible]
42	I42T	[illegible]	[illegible]	[illegible]
42	I42W	[illegible]	[illegible]	[illegible]
42	I42Y	[illegible]	[illegible]	[illegible]
43	S43A	[illegible]	[illegible]	[illegible]
43	S43D	[illegible]	[illegible]	[illegible]
43	S43E	[illegible]	[illegible]	[illegible]
43	S43F	-11.125	-0.402	[illegible]
43	S43L	[illegible]	[illegible]	[illegible]
43	S43M	2.612	[illegible]	[illegible]
43	S43N	[illegible]	[illegible]	[illegible]
43	S43W	-7.274	1.086	[illegible]
44	G44F	-5.359	0.298	[illegible]
44	G44M	-12.661	-2.567	[illegible]
44	G44Y	2.451	1.502	[illegible]
45	D45A	-0.294	[illegible]	[illegible]
45	D45C	-6.455	1.912	[illegible]
45	D45E	-1.230	[illegible]	[illegible]
45	D45F	-4.849	0.586	[illegible]
45	D45G	-6.106	2.534	[illegible]
45	D45Q	-7.477	0.879	[illegible]
45	D45S	-7.344	-0.597	[illegible]
45	D45T	-6.113	1.664	[illegible]
45	D45W	-1.352	[illegible]	[illegible]
46	T46A	-1.206	[illegible]	[illegible]
46	T46C	-0.158	[illegible]	[illegible]
46	T46D	-2.233	[illegible]	[illegible]
46	T46G	-2.206	[illegible]	[illegible]
46	T46L	[illegible]	-9.678	-9.140
46	T46N	1.300	[illegible]	[illegible]
46	T46S	1.575	[illegible]	[illegible]
46	T46V	[illegible]	-0.054	-3.090

FIGURA 42C

POSIÇÃO	MUTAÇÃO	[illegible]	[illegible]	[illegible]
46	T46W	-8.251	0.760	[illegible]
47	S47A	[illegible]	-7.577	-12.577
47	S47M	[illegible]	-2.784	-5.012
48	Q48F	-1.201	1.752	[illegible]
48	Q48M	-0.580	1.282	[illegible]
48	Q48T	[illegible]	2.879	1.431
48	Q48V	[illegible]	[illegible]	[illegible]
48	Q48W	[illegible]	[illegible]	[illegible]
48	Q48Y	2.699	[illegible]	[illegible]
49	Q49A	[illegible]	[illegible]	[illegible]
49	Q49C	[illegible]	[illegible]	[illegible]
49	Q49D	[illegible]	[illegible]	[illegible]
49	Q49E	0.055	[illegible]	[illegible]
49	Q49G	[illegible]	[illegible]	[illegible]
49	Q49H	[illegible]	[illegible]	[illegible]
49	Q49I	1.460	[illegible]	[illegible]
49	Q49K	-1.162	2.210	[illegible]
49	Q49L	[illegible]	[illegible]	[illegible]
49	Q49M	[illegible]	[illegible]	[illegible]
49	Q49R	-1.520	1.685	[illegible]
49	Q49S	[illegible]	[illegible]	[illegible]
49	Q49V	2.715	[illegible]	[illegible]
49	Q49W	0.828	[illegible]	[illegible]
49	Q49Y	2.372	[illegible]	[illegible]
50	G50A	[illegible]	[illegible]	[illegible]
50	G50C	-3.097	[illegible]	[illegible]
50	G50F	-10.720	-3.587	[illegible]
50	G50L	-8.672	0.760	[illegible]
50	G50M	-4.800	[illegible]	[illegible]
50	G50N	-13.424	-7.278	[illegible]
50	G50Q	[illegible]	[illegible]	[illegible]
50	G50S	1.734	[illegible]	[illegible]
50	G50T	-5.130	0.190	[illegible]
51	L51A	[illegible]	[illegible]	[illegible]
51	L51C	1.954	2.391	[illegible]
52	A52H	1.944	2.621	[illegible]
52	A52L	1.102	2.133	[illegible]
52	A52M	[illegible]	[illegible]	[illegible]
52	A52R	1.914	2.434	[illegible]
52	A52W	1.736	[illegible]	[illegible]
52	A52Y	0.370	1.666	[illegible]
53	R53A	1.209	[illegible]	[illegible]
53	R53E	-9.522	-4.303	[illegible]
53	R53I	-1.622	[illegible]	[illegible]
53	R53K	-1.692	1.524	[illegible]
53	R53L	-4.533	1.906	[illegible]
53	R53N	-2.528	2.000	[illegible]

FIGURA 42D

53	R53S	-2.788	1.701	[illegible]
53	R53V	-0.921	[illegible]	[illegible]
56	A56R	2.198	2.171	[illegible]
56	A56W	2.282	2.445	[illegible]
56	A56Y	1.802	2.064	[illegible]
58	L58I	2.722	2.920	[illegible]
66	V66I	1.736	2.860	[illegible]
68	V68L	[illegible]	[illegible]	[illegible]
69	E69G	-2.706	0.579	[illegible]
69	E69Q	-3.745	-0.973	[illegible]
69	E69S	-1.111	1.609	[illegible]
70	L70T	-1.234	[illegible]	[illegible]
70	L70V	0.646	[illegible]	[illegible]
72	G72A	[illegible]	[illegible]	[illegible]
73	N73A	-2.509	0.071	[illegible]
73	N73C	0.690	2.962	[illegible]
73	N73G	-12.646	-5.398	[illegible]
73	N73L	2.964	[illegible]	[illegible]
73	N73V	-3.024	1.071	[illegible]
74	D74E	-7.071	0.624	[illegible]
75	G75A	2.975	-2.755	[illegible]
75	G75K	-1.950	-6.794	[illegible]
75	G75M	1.306	-8.006	[illegible]
76	L76A	-3.537	-8.281	[illegible]
76	L76E	-5.399	-9.182	[illegible]
76	L76F	1.580	1.298	[illegible]
76	L76I	[illegible]	[illegible]	[illegible]
76	L76M	[illegible]	[illegible]	[illegible]
76	L76N	-2.468	-6.507	[illegible]
76	L76T	-0.255	-4.430	[illegible]
76	L76V	-4.196	-4.995	[illegible]
76	L76W	[illegible]	[illegible]	[illegible]
77	R77A	-3.079	-0.533	[illegible]
77	R77C	0.461	[illegible]	[illegible]
77	R77D	-2.838	2.127	[illegible]
77	R77E	-4.589	2.902	[illegible]
77	R77F	-1.292	2.850	[illegible]
77	R77G	[illegible]	[illegible]	[illegible]
77	R77H	-5.359	-2.852	[illegible]
77	R77K	1.376	[illegible]	[illegible]
77	R77L	[illegible]	[illegible]	[illegible]
77	R77N	-0.025	2.762	[illegible]
77	R77Q	[illegible]	[illegible]	[illegible]
77	R77S	0.104	[illegible]	[illegible]
77	R77V	-1.637	[illegible]	[illegible]
77	R77W	0.720	[illegible]	[illegible]
78	G78A	[illegible]	-0.533	-3.270

FIGURA 42E

POSIÇÃO	MUT	[illegible]	[illegible]	[illegible]
79	F79A	[illegible]	-3.257	-6.141
79	F79D	[illegible]	-4.371	-11.941
79	F79E	[illegible]	-5.838	-13.264
79	F79G	[illegible]	-2.922	-5.652
79	F79M	-0.425	1.923	[illegible]
79	F79V	0.611	2.531	[illegible]
79	F79W	[illegible]	-2.198	-5.513
79	F79Y	[illegible]	1.699	1.233
80	Q80G	-0.466	[illegible]	[illegible]
80	Q80L	0.197	1.684	[illegible]
80	Q80M	2.809	[illegible]	[illegible]
80	Q80S	0.014	[illegible]	[illegible]
80	Q80W	0.534	2.981	[illegible]
80	Q80Y	1.256	[illegible]	[illegible]
81	P81A	-0.430	[illegible]	[illegible]
81	P81E	1.832	[illegible]	[illegible]
81	P81K	1.207	[illegible]	[illegible]
81	P81L	0.378	[illegible]	[illegible]
81	P81M	-2.990	[illegible]	[illegible]
81	P81W	0.666	[illegible]	[illegible]
81	P81Y	[illegible]	[illegible]	[illegible]
82	Q82F	0.609	[illegible]	[illegible]
82	Q82I	1.002	2.176	[illegible]
82	Q82N	-1.675	1.981	[illegible]
82	Q82P	-1.744	2.992	[illegible]
82	Q82T	[illegible]	1.693	1.736
82	Q82V	2.235	[illegible]	[illegible]
82	Q82W	1.434	[illegible]	[illegible]
82	Q82Y	1.101	[illegible]	[illegible]
83	Q83A	[illegible]	[illegible]	[illegible]
84	T84S	0.270	2.141	[illegible]
86	Q86A	[illegible]	[illegible]	[illegible]
86	Q86T	[illegible]	[illegible]	[illegible]
87	T87A	-0.037	2.065	[illegible]
87	T87C	-0.229	2.934	[illegible]
87	T87E	1.415	[illegible]	[illegible]
87	T87F	-1.975	0.230	[illegible]
87	T87G	-0.739	2.096	[illegible]
87	T87H	-0.673	2.639	[illegible]
87	T87L	-0.419	[illegible]	[illegible]
87	T87M	-0.551	1.374	[illegible]
87	T87V	1.404	2.950	[illegible]
87	T87W	-0.755	2.064	[illegible]
91	I91L	2.206	2.297	[illegible]
91	I91V	[illegible]	[illegible]	[illegible]
92	L92V	[illegible]	[illegible]	[illegible]
93	Q93A	[illegible]	[illegible]	[illegible]

FIGURA 42F

POSIÇÃO	MUTAÇÃO	[illegible]	[illegible]	[illegible]
93	Q93E	[illegible]	2.687	2.646
93	Q93G	[illegible]	[illegible]	[illegible]
93	Q93H	[illegible]	[illegible]	[illegible]
93	Q93I	[illegible]	[illegible]	[illegible]
93	Q93Y	[illegible]	[illegible]	[illegible]
94	D94G	[illegible]	1.754	1.189
94	D94K	[illegible]	1.934	1.442
94	D94V	[illegible]	2.590	2.720
95	V95L	[illegible]	[illegible]	[illegible]
95	V95M	1.595	2.323	[illegible]
95	V95T	[illegible]	[illegible]	[illegible]
96	K96A	2.873	[illegible]	[illegible]
96	K96L	2.738	[illegible]	[illegible]
96	K96Y	[illegible]	[illegible]	[illegible]
97	A97K	2.718	[illegible]	2.788
97	A97W	2.510	2.579	[illegible]
98	A98K	2.626	2.900	[illegible]
98	A98L	2.724	[illegible]	[illegible]
98	A98W	[illegible]	[illegible]	[illegible]
99	N99C	2.700	[illegible]	2.569
99	N99G	[illegible]	[illegible]	[illegible]
99	N99L	[illegible]	[illegible]	[illegible]
99	N99M	2.867	[illegible]	2.038
99	N99P	[illegible]	[illegible]	[illegible]
99	N99Q	[illegible]	[illegible]	[illegible]
99	N99R	[illegible]	[illegible]	[illegible]
99	N99W	2.850	[illegible]	1.514
99	N99Y	[illegible]	[illegible]	[illegible]
100	A100G	[illegible]	[illegible]	[illegible]
100	A100H	0.957	[illegible]	[illegible]
100	A100I	1.009	[illegible]	[illegible]
100	A100K	1.952	[illegible]	[illegible]
100	A100R	-0.695	1.432	[illegible]
100	A100T	0.930	2.475	[illegible]
100	A100V	[illegible]	[illegible]	[illegible]
101	E101A	[illegible]	2.270	1.757
101	E101G	[illegible]	[illegible]	[illegible]
101	E101L	[illegible]	[illegible]	[illegible]
101	E101M	[illegible]	[illegible]	[illegible]
101	E101S	[illegible]	[illegible]	[illegible]
101	E101T	[illegible]	[illegible]	[illegible]
101	E101V	[illegible]	[illegible]	[illegible]
102	P102S	[illegible]	[illegible]	[illegible]
105	M105C	[illegible]	[illegible]	[illegible]
105	M105I	[illegible]	2.850	[illegible]
105	M105L	0.486	0.666	[illegible]
105	M105V	[illegible]	[illegible]	[illegible]

FIGURA 42G

Posição	MUTAÇÃO	[illegible]	[illegible]	[illegible]
106	Q106A	[illegible]	[illegible]	[illegible]
106	Q106C	1.652	[illegible]	[illegible]
106	Q106D	-0.831	-5.674	[illegible]
106	Q106G	0.911	[illegible]	[illegible]
106	Q106H	[illegible]	2.788	[illegible]
106	Q106K	0.523	[illegible]	[illegible]
106	Q106M	1.581	1.185	[illegible]
106	Q106R	1.323	[illegible]	[illegible]
106	Q106S	2.178	[illegible]	[illegible]
106	Q106T	2.225	[illegible]	[illegible]
106	Q106V	-0.434	0.829	[illegible]
106	Q106W	[illegible]	0.324	[illegible]
106	Q106Y	1.290	2.930	[illegible]
107	I107C	1.869	[illegible]	[illegible]
107	I107L	1.267	[illegible]	[illegible]
107	I107M	1.316	[illegible]	[illegible]
107	I107Q	-1.349	2.297	[illegible]
107	I107V	1.727	[illegible]	[illegible]
108	R108A	2.439	-2.014	[illegible]
108	R108D	[illegible]	-0.089	[illegible]
108	R108F	[illegible]	[illegible]	[illegible]
108	R108I	[illegible]	-2.651	[illegible]
108	R108L	0.689	-6.243	[illegible]
108	R108S	[illegible]	-0.031	[illegible]
108	R108V	0.722	-3.072	[illegible]
108	R108W	[illegible]	[illegible]	[illegible]
108	R108Y	[illegible]	-0.165	[illegible]
109	L109M	0.743	[illegible]	[illegible]
109	L109V	1.441	-1.769	[illegible]
110	P110E	[illegible]	0.955	[illegible]
110	P110F	[illegible]	-6.804	-1.807
110	P110N	[illegible]	-5.215	[illegible]
110	P110W	[illegible]	-6.699	-1.484
111	A111C	[illegible]	[illegible]	[illegible]
111	A111L	[illegible]	1.291	[illegible]
111	A111Q	[illegible]	[illegible]	[illegible]
111	A111R	[illegible]	1.936	[illegible]
111	A111V	[illegible]	2.693	[illegible]
111	A111W	[illegible]	[illegible]	[illegible]
112	N112A	[illegible]	[illegible]	[illegible]
112	N112F	[illegible]	2.537	[illegible]
112	N112G	[illegible]	[illegible]	[illegible]
112	N112I	0.819	0.171	[illegible]
112	N112L	-3.870	-3.621	[illegible]
112	N112P	1.980	2.011	[illegible]
112	N112V	2.140	1.583	[illegible]
112	N112W	[illegible]	[illegible]	[illegible]

FIGURA 42H

POSIÇÃO	MUTAÇÃO	[illegible]	[illegible]	[illegible]
112	N112Y	-0.190	1.507	[illegible]
113	Y113A	[illegible]	[illegible]	[illegible]
113	Y113D	0.785	2.906	[illegible]
113	Y113G	[illegible]	[illegible]	[illegible]
113	Y113I	[illegible]	[illegible]	[illegible]
113	Y113M	[illegible]	2.503	[illegible]
114	G114F	0.911	1.324	[illegible]
114	G114K	[illegible]	[illegible]	[illegible]
114	G114L	[illegible]	[illegible]	[illegible]
114	G114M	2.565	[illegible]	[illegible]
114	G114W	0.253	0.903	[illegible]
114	G114Y	1.840	[illegible]	[illegible]
115	R115A	[illegible]	[illegible]	[illegible]
115	R115C	[illegible]	[illegible]	[illegible]
115	R115E	[illegible]	[illegible]	[illegible]
115	R115G	[illegible]	[illegible]	[illegible]
115	R115I	2.218	2.090	[illegible]
115	R115N	[illegible]	[illegible]	[illegible]
115	R115Q	2.297	2.565	[illegible]
115	R115S	[illegible]	[illegible]	[illegible]
115	R115W	[illegible]	2.470	[illegible]
115	R115Y	[illegible]	[illegible]	[illegible]
116	R116C	2.854	2.857	[illegible]
116	R116D	[illegible]	2.880	2.274
116	R116H	2.748	[illegible]	[illegible]
116	R116T	2.464	2.657	[illegible]
116	R116V	2.951	2.874	[illegible]
116	R116W	[illegible]	[illegible]	[illegible]
117	Y117C	[illegible]	[illegible]	[illegible]
117	Y117H	2.743	[illegible]	[illegible]
117	Y117I	[illegible]	[illegible]	[illegible]
117	Y117L	[illegible]	[illegible]	[illegible]
117	Y117M	2.081	[illegible]	[illegible]
117	Y117N	[illegible]	[illegible]	[illegible]
117	Y117S	[illegible]	[illegible]	[illegible]
117	Y117T	[illegible]	[illegible]	1.889
117	Y117V	[illegible]	[illegible]	1.300
117	Y117W	-2.334	0.471	[illegible]
118	N118H	0.512	1.428	[illegible]
118	N118L	1.598	0.958	[illegible]
118	N118M	2.010	2.961	[illegible]
118	N118P	-0.832	-1.966	[illegible]
118	N118W	[illegible]	1.114	[illegible]
119	E119C	[illegible]	[illegible]	[illegible]
119	E119D	2.931	2.142	[illegible]
119	E119F	[illegible]	[illegible]	[illegible]
119	E119K	[illegible]	[illegible]	[illegible]

FIGURA 42I

POSIÇÃO	MUTAÇÃO	[illegible]	[illegible]	[illegible]
119	E119M	[illegible]	[illegible]	[illegible]
119	E119P	0.089	-3.003	[illegible]
119	E119R	[illegible]	[illegible]	[illegible]
119	E119T	2.287	2.383	[illegible]
119	E119W	[illegible]	[illegible]	[illegible]
119	E119Y	[illegible]	[illegible]	[illegible]
120	A120D	[illegible]	[illegible]	[illegible]
120	A120G	[illegible]	[illegible]	[illegible]
120	A120I	0.912	[illegible]	[illegible]
120	A120L	1.580	1.987	[illegible]
120	A120T	1.659	[illegible]	[illegible]
120	A120W	[illegible]	[illegible]	[illegible]
121	F121A	-3.589	-10.094	[illegible]
121	F121C	-0.082	-2.789	[illegible]
121	F121L	-5.058	-5.323	[illegible]
121	F121M	[illegible]	0.053	[illegible]
121	F121V	0.041	0.880	[illegible]
121	F121Y	[illegible]	2.070	[illegible]
122	S122A	2.242	1.706	[illegible]
122	S122C	-0.273	-0.816	[illegible]
122	S122D	1.254	-0.098	[illegible]
122	S122E	1.103	-4.994	[illegible]
122	S122F	[illegible]	[illegible]	[illegible]
122	S122G	0.956	0.171	[illegible]
122	S122I	[illegible]	[illegible]	[illegible]
122	S122L	[illegible]	[illegible]	[illegible]
122	S122M	[illegible]	[illegible]	[illegible]
122	S122P	-1.009	-2.338	[illegible]
122	S122V	[illegible]	[illegible]	[illegible]
122	S122W	[illegible]	[illegible]	[illegible]
122	S122Y	[illegible]	[illegible]	[illegible]
123	A123C	2.585	[illegible]	[illegible]
123	A123E	2.551	2.618	[illegible]
123	A123F	2.687	[illegible]	[illegible]
123	A123H	[illegible]	[illegible]	[illegible]
123	A123L	[illegible]	[illegible]	[illegible]
123	A123R	1.525	[illegible]	2.798
123	A123T	2.814	[illegible]	[illegible]
123	A123V	[illegible]	[illegible]	[illegible]
123	A123W	2.648	[illegible]	[illegible]
123	A123Y	2.962	[illegible]	[illegible]
124	I124A	-0.562	1.899	[illegible]
124	I124C	0.236	1.648	[illegible]
124	I124L	1.512	[illegible]	[illegible]
125	Y125F	[illegible]	[illegible]	[illegible]
125	Y125W	[illegible]	0.988	2.558
126	P126H	2.813	[illegible]	[illegible]

FIGURA 42J

POSIÇÃO	MUTAÇÃO	[illegible]	PNI_MUT2	PNI_MUT2_C
126	P126Y	[illegible]	[illegible]	[illegible]
132	F132E	[illegible]	2.969	1.705
133	D133K	[illegible]	[illegible]	[illegible]
133	D133Y	[illegible]	2.963	[illegible]
134	V134S	[illegible]	2.367	[illegible]
136	L136M	2.870	2.522	[illegible]
139	F139W	[illegible]	0.616	-0.147
140	F140C	[illegible]	-1.783	-1.192
140	F140M	[illegible]	[illegible]	[illegible]
141	M141A	[illegible]	[illegible]	[illegible]
141	M141C	[illegible]	[illegible]	[illegible]
141	M141D	[illegible]	-9.983	-11.956
141	M141F	[illegible]	-0.323	-1.087
141	M141G	[illegible]	0.266	-1.457
141	M141L	[illegible]	[illegible]	[illegible]
141	M141P	[illegible]	[illegible]	[illegible]
141	M141T	[illegible]	-2.612	-3.803
141	M141V	[illegible]	2.714	2.404
141	M141W	[illegible]	-6.189	-11.732
141	M141Y	[illegible]	-2.350	-2.470
142	E142C	[illegible]	[illegible]	[illegible]
142	E142L	-3.282	-4.875	[illegible]
142	E142M	-2.761	-2.385	[illegible]
142	E142N	1.555	1.436	[illegible]
142	E142P	[illegible]	-5.193	[illegible]
142	E142Q	0.112	-5.551	[illegible]
142	E142W	[illegible]	-0.083	1.084
143	E143P	1.430	1.276	[illegible]
145	Y145A	[illegible]	2.636	1.728
145	Y145C	[illegible]	-0.037	-1.380
145	Y145D	[illegible]	2.255	0.802
145	Y145E	[illegible]	[illegible]	1.660
145	Y145G	[illegible]	1.119	0.709
145	Y145L	[illegible]	2.153	0.684
145	Y145M	[illegible]	2.929	2.071
145	Y145N	[illegible]	1.985	1.132
145	Y145Q	[illegible]	1.374	1.497
145	Y145T	[illegible]	1.401	0.033
145	Y145W	[illegible]	0.831	1.859
146	L146A	[illegible]	1.649	1.428
146	L146C	[illegible]	1.316	1.323
146	L146D	[illegible]	1.036	0.012
146	L146E	[illegible]	1.346	0.616
146	L146G	[illegible]	1.300	2.477
146	L146H	[illegible]	0.923	0.846
146	L146S	[illegible]	1.765	2.197
146	L146W	[illegible]	1.383	1.912

FIGURA 42L

POSIÇÃO	MUTAÇÃO	[illegible]	[illegible]	[illegible]
147	K147P	[illegible]	0.241	0.155
149	Q149L	1.904	[illegible]	1.490
151	M151C	[illegible]	-0.371	2.395
151	M151I	[illegible]	-1.585	[illegible]
151	M151T	[illegible]	-0.831	2.369
151	M151V	[illegible]	-0.991	[illegible]
152	Q152L	[illegible]	2.425	1.226
153	D153I	-0.251	-1.341	[illegible]
153	D153K	0.496	[illegible]	[illegible]
153	D153M	-0.031	-0.252	[illegible]
153	D153W	0.825	1.942	[illegible]
155	G155F	0.748	[illegible]	[illegible]
155	G155H	0.577	0.713	[illegible]
155	G155W	1.260	[illegible]	[illegible]
155	G155Y	1.028	[illegible]	[illegible]
156	I156C	0.643	[illegible]	[illegible]
156	I156F	-1.220	[illegible]	[illegible]
156	I156M	1.352	[illegible]	[illegible]
156	I156V	1.058	[illegible]	[illegible]
158	P158A	[illegible]	[illegible]	[illegible]
158	P158F	[illegible]	-13.452	-15.087
158	P158G	[illegible]	[illegible]	[illegible]
158	P158S	1.396	2.691	[illegible]
159	N159C	[illegible]	2.253	1.220
159	N159G	[illegible]	[illegible]	[illegible]
159	N159I	[illegible]	0.339	-1.825
159	N159K	[illegible]	1.811	0.050
159	N159T	[illegible]	[illegible]	[illegible]
159	N159V	[illegible]	[illegible]	0.453
160	R160A	[illegible]	[illegible]	[illegible]
160	R160C	[illegible]	2.581	1.641
160	R160D	[illegible]	[illegible]	2.706
160	R160E	[illegible]	[illegible]	1.951
160	R160G	[illegible]	[illegible]	[illegible]
160	R160H	[illegible]	[illegible]	[illegible]
160	R160N	[illegible]	[illegible]	[illegible]
160	R160Q	[illegible]	[illegible]	0.989
160	R160S	[illegible]	[illegible]	1.913
160	R160W	[illegible]	[illegible]	[illegible]
161	D161G	[illegible]	2.804	[illegible]
161	D161I	[illegible]	[illegible]	[illegible]
161	D161K	[illegible]	[illegible]	[illegible]
161	D161L	[illegible]	[illegible]	[illegible]
161	D161M	[illegible]	[illegible]	[illegible]
161	D161N	1.985	[illegible]	[illegible]
161	D161Q	[illegible]	[illegible]	[illegible]
161	D161R	[illegible]	2.933	[illegible]

FIGURA 42M

POSIÇÃO	MUTAÇÃO	[illegible]	[illegible]	[illegible]
161	D161S	2.066	2.033	3.738
161	D161V	2.584	2.273	[illegible]
161	D161W	[illegible]	[illegible]	[illegible]
162	A162G	1.092	2.969	[illegible]
163	Q163G	[illegible]	[illegible]	[illegible]
163	Q163L	[illegible]	[illegible]	[illegible]
163	Q163M	[illegible]	[illegible]	[illegible]
163	Q163S	[illegible]	[illegible]	[illegible]
164	P164A	[illegible]	2.729	[illegible]
164	P164C	[illegible]	[illegible]	[illegible]
164	P164D	[illegible]	2,709	1.181
164	P164K	2.978	2.832	[illegible]
164	P164L	2.884	2.488	[illegible]
164	P164M	[illegible]	[illegible]	[illegible]
164	P164N	[illegible]	2.408	[illegible]
164	P164R	[illegible]	2.698	[illegible]
164	P164T	2.855	1.824	[illegible]
164	P164V	[illegible]	2.173	2.366
164	P164W	[illegible]	2.758	[illegible]
165	F165G	2.593	0.257	[illegible]
165	F165H	[illegible]	2.655	[illegible]
165	F165K	[illegible]	-2.230	-3.292
165	F165M	[illegible]	0.917	-0.403
165	F165R	[illegible]	-2.313	-1.664
165	F165S	[illegible]	1.864	[illegible]
165	F165T	[illegible]	-2.331	-3.829
165	F165W	0.010	0.235	[illegible]
165	F165Y	[illegible]	2.345	[illegible]
166	I166L	[illegible]	[illegible]	[illegible]
166	I166V	[illegible]	[illegible]	[illegible]
167	A167C	[illegible]	[illegible]	1.380
167	A167T	[illegible]	[illegible]	[illegible]
168	D168A	2.457	2.548	[illegible]
168	D168G	[illegible]	[illegible]	[illegible]
168	D168H	2.674	[illegible]	[illegible]
168	D168R	[illegible]	[illegible]	[illegible]
168	D168T	2.600	2.800	[illegible]
169	W169A	2.642	[illegible]	[illegible]
169	W169E	[illegible]	[illegible]	[illegible]
169	W169K	[illegible]	[illegible]	[illegible]
169	W169Q	[illegible]	[illegible]	[illegible]
169	W169R	1.304	1.991	[illegible]
169	W169S	2.189	[illegible]	[illegible]
169	W169T	1.785	2.162	[illegible]
169	W169V	1.067	0.726	[illegible]
170	M170F	[illegible]	[illegible]	[illegible]
170	M170V	[illegible]	[illegible]	[illegible]

FIGURA 42N

POSIÇÃO	MUTAÇÃO	[illegible]	[illegible]	[illegible]
172	K172M	[illegible]	[illegible]	2.023
173	Q173N	[illegible]	[illegible]	[illegible]
173	Q173W	1.146	1.915	[illegible]
175	Q175I	[illegible]	[illegible]	[illegible]
175	Q175Y	2.746	2.780	[illegible]
176	P176H	[illegible]	[illegible]	[illegible]
176	P176K	[illegible]	[illegible]	[illegible]
176	P176L	2.672	[illegible]	[illegible]
176	P176N	[illegible]	[illegible]	2.671
176	P176R	2.964	2.174	[illegible]
176	P176W	[illegible]	[illegible]	[illegible]
176	P176Y	2.764	2.738	[illegible]
178	V178T	[illegible]	2.694	[illegible]
178	V178W	[illegible]	2.786	[illegible]
179	N179G	[illegible]	2.391	1.826
179	N179H	[illegible]	[illegible]	[illegible]
179	N179R	[illegible]	[illegible]	[illegible]
179	N179T	[illegible]	2.829	[illegible]
179	N179V	[illegible]	2.799	[illegible]
179	N179Y	[illegible]	[illegible]	[illegible]
180	H180A	2.979	[illegible]	2.634
180	H180G	[illegible]	[illegible]	[illegible]
180	H180R	[illegible]	2.264	[illegible]
180	H180S	1.578	1.692	[illegible]
180	H180V	[illegible]	2.490	2.811
180	H180W	[illegible]	2.513	[illegible]
181	D181A	[illegible]	2.584	[illegible]
181	D181H	[illegible]	[illegible]	[illegible]
181	D181I	[illegible]	[illegible]	[illegible]
181	D181L	[illegible]	[illegible]	[illegible]
181	D181P	[illegible]	2.523	2.960
181	D181Q	2.775	2.594	[illegible]
181	D181R	[illegible]	[illegible]	[illegible]
181	D181S	2.912	2.871	[illegible]
181	D181W	[illegible]	[illegible]	[illegible]
182	S182A	[illegible]	2.728	[illegible]
182	S182G	[illegible]	2.190	[illegible]
182	S182I	2.625	2.695	[illegible]
182	S182K	[illegible]	[illegible]	[illegible]
182	S182L	[illegible]	[illegible]	[illegible]
182	S182P	[illegible]	[illegible]	[illegible]
182	S182Q	2.495	0.896	[illegible]
182	S182R	[illegible]	[illegible]	[illegible]
182	S182T	2.619	1.235	[illegible]

FIGURA 43A

POSIÇÃO	MUTAÇÃO	MOD 2 SUBSTRATO	MOD 3 SUBSTRATO	MOD 4 SUBSTRATO
1	A1L	[illegible]	-37.653	-2.752
1	A1Q	-2.486	[illegible]	-9.186
1	A1S	-23.759	[illegible]	[illegible]
1	A1V	-2.350	[illegible]	-11.124
2	D2E	-0.668	[illegible]	-5.543
2	D2K	-0.305	[illegible]	-11.357
2	D2P	-6.441	[illegible]	-1.667
2	D2W	-3.805	[illegible]	-9.961
3	T3K	[illegible]	-2.945	-3.760
3	T3R	-2.123	[illegible]	-7.326
3	T3W	-2.285	[illegible]	-4.461
4	L4A	[illegible]	[illegible]	-14.912
4	L4S	0.968	-2.325	[illegible]
4	L4Y	-15.139	[illegible]	[illegible]
5	L5F	-3.514	[illegible]	-8.569
5	L5G	-11.850	[illegible]	-0.504
5	L5H	-5.668	-18.894	[illegible]
5	L5S	-6.262	[illegible]	-0.005
5	L5Y	-19.759	[illegible]	[illegible]
6	I6T	-3.743	[illegible]	-5.797
6	I6V	-9.941	[illegible]	2.442
7	L7A	-5.015	[illegible]	-9.807
7	L7C	-9.123	[illegible]	[illegible]
7	L7M	-1.148	[illegible]	-3.124
7	L7N	-23.486	[illegible]	[illegible]
7	L7S	-21.759	[illegible]	[illegible]
7	L7T	-17.077	[illegible]	[illegible]
7	L7V	[illegible]	1.108	-9.460
7	L7Y	-24.305	[illegible]	[illegible]
8	G8S	-13.718	2.133	[illegible]
9	D9N	[illegible]	-7.515	[illegible]
9	D9T	-40.636	-2.082	[illegible]
11	L11C	-35.128	-5.595	[illegible]
11	L11I	-13.652	-0.536	[illegible]
11	L11M	-32.833	[illegible]	[illegible]
11	L11Q	-41.620	-0.115	[illegible]
11	L11V	-19.849	-6.977	[illegible]
12	S12A	[illegible]	-2.948	-2.736
12	S12I	-26.505	[illegible]	[illegible]
12	S12L	-21.879	0.349	[illegible]
12	S12M	-17.035	0.167	[illegible]
12	S12T	-7.390	2.766	[illegible]
12	S12V	-25.521	[illegible]	[illegible]
13	A13C	-9.325	[illegible]	2.581
13	A13D	[illegible]	-15.227	-22.702

FIGURA 43B

POSIÇÃO	MUTAÇÃO	[illegible]	[illegible]	[illegible]
13	A13G	-28.452	[illegible]	-2.137
13	A13H	-12.806	[illegible]	[illegible]
13	A13I	-14.177	[illegible]	[illegible]
13	A13L	-30.387	[illegible]	[illegible]
13	A13N	-3.062	[illegible]	-1.433
13	A13T	-12.269	[illegible]	[illegible]
13	A13V	-4.275	-0.630	[illegible]
13	A13W	-26.301	[illegible]	0.282
14	G14A	[illegible]	-13.198	-1.573
14	G14E	[illegible]	0.611	-6.750
14	G14F	-44.312	[illegible]	[illegible]
14	G14I	-37.226	[illegible]	[illegible]
14	G14K	-24.419	[illegible]	-22.056
14	G14M	-16.669	[illegible]	-6.011
14	G14P	[illegible]	-7.375	-5.306
14	G14Q	[illegible]	-15.179	-13.185
14	G14R	[illegible]	-14.406	[illegible]
14	G14S	[illegible]	-11.496	-6.715
14	G14T	-12.570	1.759	[illegible]
14	G14V	-18.570	-5.806	[illegible]
15	Y15A	-75.656	[illegible]	[illegible]
15	Y15C	-39.128	[illegible]	[illegible]
15	Y15D	-74.258	[illegible]	[illegible]
15	Y15E	-32.800	[illegible]	[illegible]
15	Y15G	-47.292	[illegible]	[illegible]
15	Y15I	-44.407	[illegible]	[illegible]
15	Y15L	-73.290	[illegible]	[illegible]
15	Y15M	-73.452	[illegible]	[illegible]
15	Y15N	-43.062	[illegible]	[illegible]
15	Y15Q	-72.323	[illegible]	[illegible]
15	Y15R	-92.269	[illegible]	[illegible]
15	Y15S	-75.065	[illegible]	[illegible]
15	Y15V	-41.259	[illegible]	[illegible]
16	R16D	-8.774	[illegible]	0.524
16	R16E	-5.011	[illegible]	-5.363
16	R16G	[illegible]	-21.411	-6.573
16	R16H	-7.914	[illegible]	-3.427
16	R16I	-0.280	[illegible]	-6.008
16	R16L	[illegible]	-4.406	-5.040
16	R16M	[illegible]	-4.647	-6.250
16	R16N	[illegible]	-6.821	-3.508
16	R16P	[illegible]	-35.710	-17.460
16	R16Q	[illegible]	-0.155	-5.847
16	R16S	-5.871	[illegible]	1.815
16	R16T	[illegible]	-0.583	-2.877
16	R16V	-6.086	[illegible]	-4.556
16	R16W	-23.129	[illegible]	[illegible]

FIGURA 43C

[illegible]	MUTAÇÃO	[illegible]	[illegible]	[illegible]
17	M17A	-3.645	[illegible]	-2.657
17	M17C	[illegible]	-3.557	-1.398
17	M17G	-9.032	[illegible]	[illegible]
17	M17K	-13.259	[illegible]	[illegible]
17	M17L	[illegible]	-3.628	1.102
17	M17N	-11.390	[illegible]	[illegible]
17	M17P	-20.005	[illegible]	[illegible]
17	M17Q	-5.632	[illegible]	1.479
17	M17R	-35.521	[illegible]	[illegible]
17	M17S	-11.030	[illegible]	[illegible]
17	M17T	[illegible]	-2.597	-0.271
17	M17V	[illegible]	-9.201	-2.173
18	S18M	0.112	[illegible]	-3.934
18	S18N	0.015	[illegible]	-5.033
19	A19L	-6.717	[illegible]	-2.989
21	A21I	-3.083	[illegible]	0.989
21	A21L	-4.278	[illegible]	1.385
21	A21Y	-5.124	[illegible]	-2.411
22	A22C	[illegible]	-2.433	-3.957
22	A22D	[illegible]	-5.646	-7.477
22	A22E	[illegible]	-2.711	-8.694
22	A22F	-12.514	[illegible]	-6.786
22	A22G	[illegible]	-4.220	-1.670
22	A22H	[illegible]	-2.695	-5.240
22	A22I	[illegible]	-2.334	-5.832
22	A22K	[illegible]	0.125	-12.082
22	A22L	-19.620	[illegible]	[illegible]
22	A22M	-11.636	[illegible]	1.109
22	A22N	[illegible]	-7.830	0.264
22	A22R	-6.132	[illegible]	-0.286
22	A22Y	-19.310	[illegible]	[illegible]
23	W23Y	-1.403	-0.711	[illegible]
24	P24A	[illegible]	-3.805	-3.538
24	P24C	[illegible]	-3.072	-6.030
24	P24D	[illegible]	-5.564	-0.832
24	P24F	[illegible]	-4.793	-9.878
24	P24G	-7.553	[illegible]	0.056
24	P24I	[illegible]	1.190	-19.977
24	P24S	[illegible]	-1.630	-1.128
24	P24T	[illegible]	-2.892	-7.378
24	P24V	[illegible]	-6.072	-4.944
24	P24W	[illegible]	-0.007	-6.885
25	A25R	-5.375	[illegible]	0.902
26	L26C	-6.311	2.183	[illegible]
26	L26D	-6.712	[illegible]	-2.083
26	L26E	-2.278	[illegible]	-0.044
26	L26F	-16.378	[illegible]	[illegible]

FIGURA 43D

	MUTAÇÃO			
26	L26G	-6.244		-2.051
26	L26H	-8.302		
26	L26I	-1.937		0.176
26	L26K	-4.717		2.396
26	L26N	-8.819		-0.305
26	L26R	-3.717		1.670
26	L26S	-8.217		2.235
26	L26W	-9.254		-0.717
26	L26Y	-14.706		
27	L27A	-8.050		-3.130
27	L27C	-5.059		-0.242
27	L27F	-6.512		0.806
27	L27M	-2.595		0.374
27	L27W	-12.365		-8.559
27	L27Y	-6.815		2.044
28	N28A		-1.564	-2.019
28	N28P	-5.254	2.668	
28	N28W	-1.947		-1.930
29	D29P	-5.799		-1.589
29	D29V	-2.063	0.188	
30	K30P	-4.941		0.439
31	W31E	-2.309		-2.047
31	W31N	-3.410		-0.543
32	Q32V		-1.954	-2.135
32	Q32Y		-2.646	-2.135
33	S33F	-1.224	-0.570	
36	S36H	-0.796	-1.048	
37	V37F	-1.234		-4.023
37	V37H	-23.808	0.319	
37	V37Q	1.461	-7.507	
37	V37S	-11.174		-2.521
37	V37W	-4.480		0.643
38	V38D	-13.150		-3.554
38	V38E		-3.522	-4.164
38	V38G	-3.210		-6.981
38	V38K		-1.348	-1.535
38	V38P	-15.665		-7.826
38	V38R		-4.029	-0.831
39	N39A		-5.051	-4.795
39	N39C	-3.868		-0.080
39	N39E	-9.497		-8.061
39	N39F	-11.076	-1.921	
39	N39G	-1.114		-6.371
39	N39M	-4.250	-0.603	
39	N39Q	-34.766		
39	N39T		-1.565	-5.526
39	N39V	-2.894	-1.279	

FIGURA 43E

posição	mutação	[illegible]	[illegible]	[illegible]
39	N39W	-18.000	[illegible]	[illegible]
39	N39Y	-29.138	-9.609	[illegible]
40	A40D	[illegible]	[illegible]	-9.751
40	A40G	-2.671	-4.754	[illegible]
40	A40H	[illegible]	0.142	-2.847
40	A40L	-9.253	[illegible]	2.391
40	A40M	-2.431	[illegible]	-1.300
40	A40P	-30.635	[illegible]	[illegible]
40	A40T	-7.222	0.826	[illegible]
40	A40V	-7.301	1.738	[illegible]
40	A40Y	-2.431	[illegible]	-5.667
41	S41C	-8.846	[illegible]	1.365
41	S41P	-22.604	2.786	[illegible]
41	S41T	-28.989	[illegible]	[illegible]
42	I42D	-12.486	0.852	[illegible]
42	I42G	-10.282	-0.119	[illegible]
42	I42K	-4.953	[illegible]	-0.273
42	I42P	-19.197	[illegible]	[illegible]
42	I42S	-6.509	2.387	[illegible]
43	S43A	-4.055	[illegible]	0.698
43	S43C	[illegible]	-0.232	-2.530
43	S43F	-33.923	[illegible]	[illegible]
43	S43G	-22.314	[illegible]	[illegible]
43	S43H	-24.346	[illegible]	[illegible]
43	S43L	-1.259	-3.574	[illegible]
43	S43P	[illegible]	-3.125	-4.720
43	S43R	-15.955	[illegible]	1.781
43	S43T	-14.768	[illegible]	[illegible]
43	S43V	-8.541	[illegible]	[illegible]
43	S43W	-25.190	2.711	[illegible]
44	G44A	-8.980	2.981	[illegible]
44	G44C	-31.232	[illegible]	[illegible]
44	G44E	-24.556	[illegible]	[illegible]
44	G44F	-20.625	-3.499	[illegible]
44	G44H	-29.042	[illegible]	[illegible]
44	G44K	-17.377	[illegible]	[illegible]
44	G44L	-42.261	[illegible]	[illegible]
44	G44M	-20.466	2.419	[illegible]
44	G44N	-19.648	[illegible]	[illegible]
44	G44Q	-36.536	[illegible]	[illegible]
44	G44R	-11.367	[illegible]	[illegible]
44	G44S	-24.088	[illegible]	[illegible]
44	G44W	-12.402	-7.257	[illegible]
44	G44Y	-4.272	-8.961	[illegible]
45	D45A	-27.495	[illegible]	[illegible]
45	D45C	-21.997	[illegible]	[illegible]
45	D45E	-10.071	[illegible]	[illegible]

FIGURA 43F

POSIÇÃO	MUTAÇÃO	[illegible]	[illegible]	[illegible]
45	D45F	-29.067	[illegible]	[illegible]
45	D45G	-48.829	0.424	[illegible]
45	D45H	-18.448	[illegible]	[illegible]
45	D45I	-6.720	[illegible]	0.630
45	D45K	-37.257	[illegible]	-7.671
45	D45L	-7.433	[illegible]	0.675
45	D45M	-26.257	[illegible]	[illegible]
45	D45P	-42.156	[illegible]	[illegible]
45	D45Q	-24.346	[illegible]	[illegible]
45	D45S	-21.074	[illegible]	[illegible]
45	D45T	-20.414	[illegible]	[illegible]
45	D45V	-10.335	[illegible]	[illegible]
45	D45W	-11.232	[illegible]	[illegible]
46	T46A	-14.214	2.511	[illegible]
46	T46C	-13.923	[illegible]	[illegible]
46	T46D	-36.257	-4.446	[illegible]
46	T46E	[illegible]	-6.192	-10.318
46	T46F	[illegible]	-4.483	-36.259
46	T46G	-45.971	-1.509	[illegible]
46	T46I	[illegible]	-1.435	-44.847
46	T46K	-11.876	[illegible]	[illegible]
46	T46L	[illegible]	-19.608	-11.966
46	T46N	-9.385	[illegible]	[illegible]
46	T46R	-13.114	[illegible]	-1.435
46	T46S	-14.108	1.040	[illegible]
46	T46V	[illegible]	-4.892	-32.965
46	T46W	-28.066	2.012	[illegible]
47	S47A	[illegible]	-16.416	-91.082
47	S47C	[illegible]	-11.254	-7.971
47	S47E	-45.162	-9.539	[illegible]
47	S47F	[illegible]	-4.845	-2.530
47	S47G	[illegible]	-9.209	-7.564
47	S47L	[illegible]	-15.743	-11.131
47	S47M	[illegible]	-15.693	-9.415
47	S47P	-38.971	[illegible]	[illegible]
47	S47Q	-66.257	[illegible]	[illegible]
47	S47T	[illegible]	-3.648	-0.860
47	S47V	[illegible]	-19.085	-12.372
47	S47W	-27.776	-8.761	[illegible]
47	S47Y	-49.305	-2.513	[illegible]
48	Q48C	-2.921	-0.781	[illegible]
48	Q48D	[illegible]	-1.546	-42.376
48	Q48E	[illegible]	[illegible]	-41.906
48	Q48F	-9.042	-0.332	[illegible]
48	Q48G	[illegible]	-1.454	-2.327
48	Q48I	-3.554	0.017	[illegible]
48	Q48M	-5.876	-0.406	[illegible]

FIGURA 43G

POSIÇÃO	MUTAÇÃO	[illegible]	[illegible]	[illegible]
48	Q48S	[illegible]	-0.320	-16.024
48	Q48T	[illegible]	-3.257	-11.082
48	Q48V	-9.114	-5.450	[illegible]
48	Q48W	-4.114	-5.078	[illegible]
48	Q48Y	-7.876	-4.892	[illegible]
49	Q49A	-32.553	[illegible]	[illegible]
49	Q49C	-9.095	-2.526	[illegible]
49	Q49D	-28.813	-4.625	[illegible]
49	Q49E	-42.634	0.688	[illegible]
49	Q49G	-35.398	1.833	[illegible]
49	Q49H	-7.222	-1.529	[illegible]
49	Q49I	-40.276	[illegible]	[illegible]
49	Q49K	-7.776	[illegible]	[illegible]
49	Q49L	-20.195	[illegible]	[illegible]
49	Q49M	-16.211	2.771	[illegible]
49	Q49P	-28.383	[illegible]	[illegible]
49	Q49R	-27.431	[illegible]	[illegible]
49	Q49S	-32.959	-2.542	[illegible]
49	Q49V	-36.455	[illegible]	[illegible]
49	Q49W	-43.122	[illegible]	[illegible]
49	Q49Y	-25.236	[illegible]	[illegible]
50	G50A	-28.650	-7.750	[illegible]
50	G50C	-69.057	[illegible]	[illegible]
50	G50E	-125.886	-16.708	[illegible]
50	G50F	-100.114	[illegible]	[illegible]
50	G50I	-119.951	[illegible]	[illegible]
50	G50K	-114.098	[illegible]	[illegible]
50	G50L	-104.341	[illegible]	[illegible]
50	G50M	-86.537	-1.708	[illegible]
50	G50N	-110.114	[illegible]	[illegible]
50	G50P	-20.185	[illegible]	[illegible]
50	G50Q	-68.081	-17.958	[illegible]
50	G50R	-18.604	[illegible]	[illegible]
50	G50S	-9.658	0.432	[illegible]
50	G50T	-19.026	[illegible]	[illegible]
50	G50W	-138.488	-14.833	[illegible]
50	G50Y	-132.797	[illegible]	[illegible]
51	L51C	-3.366	-0.563	[illegible]
51	L51D	-21.821	[illegible]	[illegible]
51	L51F	[illegible]	0.479	-8.733
51	L51H	[illegible]	1.000	-5.267
51	L51N	-2.959	[illegible]	-1.703
51	L51S	-2.472	-2.438	[illegible]
51	L51T	-6.134	[illegible]	1.972
51	L51V	-13.528	[illegible]	[illegible]
51	L51W	2.813	[illegible]	-6.356
51	L51Y	[illegible]	2.458	-8.436

FIGURA 43H

52	A52C	-3.691	[illegible]	1.564
52	A52D	[illegible]	-4.417	-14.772
52	A52H	-6.293	-1.813	[illegible]
52	A52I	-10.927	1.938	[illegible]
52	A52L	-10.439	-1.500	[illegible]
52	A52M	-6.537	-2.333	[illegible]
52	A52P	-12.248	[illegible]	[illegible]
52	A52R	-4.911	-1.917	[illegible]
52	A52V	-5.967	0.375	[illegible]
52	A52W	-21.171	-7.958	[illegible]
52	A52Y	-2.715	0.889	[illegible]
53	R53A	-23.023	[illegible]	[illegible]
53	R53C	-17.173	[illegible]	[illegible]
53	R53D	-61.107	[illegible]	[illegible]
53	R53E	-53.598	[illegible]	[illegible]
53	R53F	-22.670	[illegible]	[illegible]
53	R53G	-27.889	[illegible]	[illegible]
53	R53I	-33.215	[illegible]	[illegible]
53	R53K	-9.026	[illegible]	[illegible]
53	R53L	-39.575	[illegible]	[illegible]
53	R53N	-25.092	[illegible]	[illegible]
53	R53S	-25.284	[illegible]	[illegible]
53	R53T	-16.014	[illegible]	[illegible]
53	R53V	-32.257	[illegible]	[illegible]
53	R53W	-51.375	[illegible]	[illegible]
53	R53Y	-44.556	[illegible]	[illegible]
54	L54A	-0.494	[illegible]	-5.194
54	L54C	-0.341	[illegible]	-2.916
54	L54E	-7.697	[illegible]	-1.734
54	L54F	-8.732	[illegible]	-2.451
54	L54G	-8.195	[illegible]	-1.987
54	L54M	-4.517	[illegible]	-5.278
54	L54N	-8.540	[illegible]	-0.932
54	L54S	-5.360	[illegible]	-3.844
54	L54T	[illegible]	0.279	-4.857
54	L54W	-16.433	[illegible]	[illegible]
54	L54Y	-36.088	[illegible]	[illegible]
55	P55Y	-2.716	[illegible]	-6.460
56	A56P	[illegible]	-3.557	-2.114
56	A56W	-1.261	-3.740	[illegible]
56	A56Y	-1.682	-2.826	[illegible]
57	L57A	-0.292	[illegible]	-7.234
57	L57C	-1.542	[illegible]	-5.863
57	L57F	-10.431	[illegible]	[illegible]
57	L57K	-3.069	[illegible]	-6.669
57	L57P	-2.068	[illegible]	-3.115
57	L57Q	-0.708	[illegible]	-19.895

FIGURA 43I

Posição	Mutação	[illegible]	[illegible]	[illegible]
57	L57R	-4.042	[illegible]	-7.395
57	L57Y	-4.690	[illegible]	-0.702
58	L58A	-8.023	[illegible]	-1.992
58	L58D	-10.755	[illegible]	-17.476
58	L58E	-11.079	[illegible]	-3.202
58	L58F	-5.616	1.373	[illegible]
58	L58G	-16.773	[illegible]	-0.298
58	L58H	-11.727	[illegible]	-1.266
58	L58N	-9.227	[illegible]	-5.460
58	L58R	-4.523	[illegible]	-0.559
58	L58S	-9.782	[illegible]	-4.411
58	L58W	-8.903	[illegible]	-3.444
58	L58Y	-20.199	[illegible]	[illegible]
59	K59R	[illegible]	-1.817	-1.750
60	Q60M	[illegible]	-2.892	-1.669
60	Q60P	-1.727	[illegible]	-7.879
61	H61D	-2.368	[illegible]	-1.778
61	H61G	-0.677	[illegible]	-3.583
61	H61P	-5.801	[illegible]	-2.426
62	Q62P	-1.522	[illegible]	-3.537
62	Q62W	0.517	[illegible]	-3.398
63	P63I	-1.672	[illegible]	-2.519
63	P63L	-3.313	[illegible]	-3.907
63	P63N	-3.800	[illegible]	-3.341
63	P63S	-6.199	[illegible]	-1.639
63	P63T	-5.552	[illegible]	-0.435
63	P63V	-1.821	[illegible]	-0.944
63	P63W	-8.488	[illegible]	-3.491
64	R64D	[illegible]	-1.337	-3.444
64	R64E	[illegible]	-0.930	-2.981
64	R64F	-0.229	[illegible]	-3.167
64	R64P	-10.975	[illegible]	-3.907
64	R64Q	[illegible]	-3.779	-0.713
64	R64W	-5.652	[illegible]	-5.759
64	R64Y	-3.512	[illegible]	-0.435
65	W65A	-0.180	[illegible]	-7.393
65	W65E	-4.203	[illegible]	-6.143
65	W65G	-3.453	[illegible]	-1.837
65	W65K	-2.289	[illegible]	-0.607
65	W65M	-1.820	[illegible]	-4.000
65	W65N	1.969	[illegible]	-5.920
65	W65V	2.867	[illegible]	-6.634
66	V66I	-4.164	0.598	[illegible]
66	V66M	-3.578	[illegible]	-0.786
66	V66S	-2.986	[illegible]	-2.414
67	L67A	-3.969	[illegible]	-0.071
67	L67T	-7.016	[illegible]	2.295

FIGURA 43J

POSIÇÃO	MUTAÇÃO	[illegible]	[illegible]	[illegible]
68	V68A	-6.742	[illegible]	0.955
68	V68M	-1.352	[illegible]	-10.384
68	V68S	-11.469	[illegible]	-8.777
68	V68T	-1.586	[illegible]	-1.545
69	E69A	-22.982	[illegible]	[illegible]
69	E69C	-27.267	[illegible]	[illegible]
69	E69D	-12.881	[illegible]	[illegible]
69	E69F	-8.037	-2.814	[illegible]
69	E69G	-19.465	[illegible]	[illegible]
69	E69H	-29.722	[illegible]	[illegible]
69	E69K	-31.846	[illegible]	[illegible]
69	E69L	-31.663	[illegible]	[illegible]
69	E69M	-20.088	[illegible]	[illegible]
69	E69N	-24.264	[illegible]	[illegible]
69	E69P	-8.107	[illegible]	0.694
69	E69Q	-12.685	0.500	[illegible]
69	E69S	-7.881	1.378	[illegible]
69	E69V	-17.560	[illegible]	[illegible]
69	E69Y	-14.996	[illegible]	[illegible]
70	L70A	-15.803	[illegible]	[illegible]
70	L70C	-25.143	[illegible]	[illegible]
70	L70E	-13.800	[illegible]	[illegible]
70	L70F	-39.355	[illegible]	[illegible]
70	L70H	-65.873	[illegible]	[illegible]
70	L70I	-0.564	[illegible]	-8.529
70	L70K	-31.663	[illegible]	-36.667
70	L70Q	-38.916	[illegible]	[illegible]
70	L70S	-29.832	[illegible]	[illegible]
70	L70T	-40.915	[illegible]	[illegible]
70	L70V	-13.714	[illegible]	[illegible]
70	L70W	-49.136	2.894	[illegible]
71	G71A	-8.513	[illegible]	-13.824
72	G72A	[illegible]	-24.937	[illegible]
72	G72C	[illegible]	-32.504	[illegible]
72	G72P	[illegible]	-30.115	[illegible]
72	G72S	[illegible]	-40.558	[illegible]
73	N73A	-29.185	-1.819	[illegible]
73	N73C	-24.471	-13.119	[illegible]
73	N73G	-60.831	[illegible]	[illegible]
73	N73H	-74.207	[illegible]	[illegible]
73	N73I	-69.846	2.305	[illegible]
73	N73L	-51.872	-22.497	[illegible]
73	N73P	-49.890	-4.079	[illegible]
73	N73R	-58.084	[illegible]	[illegible]
73	N73S	-58.040	[illegible]	[illegible]
73	N73T	-73.034	[illegible]	[illegible]
73	N73V	-26.508	-2.816	[illegible]

FIGURA 43L

POSIÇÃO	MUTAÇÃO	[illegible]	[illegible]	[illegible]
73	N73W	-74.912	0.723	[illegible]
74	D74E	-41.254	[illegible]	[illegible]
74	D74G	-38.954	[illegible]	[illegible]
75	G75A	[illegible]	-24.747	[illegible]
75	G75C	[illegible]	-64.804	[illegible]
75	G75D	[illegible]	-49.619	[illegible]
75	G75E	[illegible]	-60.889	[illegible]
75	G75F	[illegible]	-80.201	[illegible]
75	G75I	[illegible]	-47.816	[illegible]
75	G75K	[illegible]	-23.671	[illegible]
75	G75L	[illegible]	-37.753	[illegible]
75	G75M	[illegible]	-33.386	[illegible]
75	G75N	[illegible]	-49.143	[illegible]
75	G75P	[illegible]	-46.762	[illegible]
75	G75T	[illegible]	-72.476	[illegible]
75	G75V	[illegible]	-96.709	2.526
75	G75W	[illegible]	-79.196	[illegible]
75	G75Y	[illegible]	-71.630	[illegible]
76	L76A	[illegible]	-26.297	[illegible]
76	L76C	-3.767	-33.401	[illegible]
76	L76D	[illegible]	-33.853	[illegible]
76	L76E	2.008	-21.772	[illegible]
76	L76F	-13.754	-17.278	[illegible]
76	L76G	[illegible]	-26.171	[illegible]
76	L76I	-15.703	-13.259	[illegible]
76	L76K	[illegible]	-46.226	[illegible]
76	L76M	[illegible]	-25.209	[illegible]
76	L76N	[illegible]	-21.108	[illegible]
76	L76P	[illegible]	-40.689	[illegible]
76	L76Q	[illegible]	-42.610	[illegible]
76	L76R	[illegible]	-45.153	[illegible]
76	L76T	2.008	-23.259	[illegible]
76	L76V	-14.075	-40.576	[illegible]
76	L76W	[illegible]	-28.449	[illegible]
77	R77A	-22.007	-7.714	[illegible]
77	R77C	-25.130	-8.190	[illegible]
77	R77D	-28.288	[illegible]	[illegible]
77	R77E	-36.975	[illegible]	[illegible]
77	R77F	-28.674	-18.032	[illegible]
77	R77G	-16.254	-3.544	[illegible]
77	R77H	-28.393	-9.884	[illegible]
77	R77K	-8.288	[illegible]	[illegible]
77	R77L	0.864	-7.152	[illegible]
77	R77N	-15.340	-2.899	[illegible]
77	R77Q	[illegible]	-8.455	-10.982
77	R77S	-20.639	0.540	[illegible]
77	R77V	-36.636	-4.367	[illegible]

FIGURA 43M

POSIÇÃO	MUTAÇÃO			
77	R77W	-26.814	-26.127	
78	G78A		-17.820	-27.298
78	G78C		-33.799	-34.053
78	G78D	-4.147		-15.895
78	G78E		-9.272	-21.526
78	G78F		-23.671	-9.421
78	G78M		-21.392	-16.526
78	G78N		-19.460	-51.947
78	G78P	-15.060	-11.524	
78	G78Q		-8.878	-37.123
78	G78R		-35.000	-23.401
78	G78S		-12.184	-15.309
78	G78T		-28.984	-53.526
78	G78V		-21.994	-13.829
78	G78Y		-48.085	-48.877
79	F79A		-4.286	-10.157
79	F79D		-15.253	-17.842
79	F79E		-16.677	-18.697
79	F79G		-5.504	-10.133
79	F79H		-4.778	-8.467
79	F79M	-3.406	-1.510	
79	F79N		-4.183	-9.759
79	F79P	-36.890		
79	F79Q		-2.800	-10.157
79	F79V	-1.942	0.926	
79	F79W		-4.327	-10.227
80	Q80A	-1.822	1.091	
80	Q80E		-6.456	-11.033
80	Q80G	-26.000	-1.108	
80	Q80L	-7.949	-0.316	
80	Q80M	-7.186	-1.804	
80	Q80S	-17.483	0.475	
80	Q80W	-3.107	-0.478	
80	Q80Y	-10.915	-2.120	
81	P81A	-3.368	2.009	
81	P81E	-8.966	1.329	
81	P81K	-3.077	0.245	
81	P81M	-5.049		
81	P81N		-2.748	-8.845
81	P81T		-1.675	-6.878
81	P81W	-21.339	2.690	
81	P81Y	-3.032	0.678	
82	Q82F	-2.987	0.750	
82	Q82I	-5.831	-0.538	
82	Q82N	-3.092	2.329	
82	Q82P	-4.556	1.380	
82	Q82R		-0.253	-3.072

FIGURA 43N

Po	Mut			
82	Q82S		-1.994	-1.757
82	Q82W	-4.287	0.028	
82	Q82Y	-3.413	0.348	
83	Q83C		-11.709	-11.954
83	Q83F		-8.418	-9.651
83	Q83G		-16.044	-14.553
83	Q83K		-10.063	-9.684
83	Q83L		-17.532	-15.243
83	Q83M		-8.449	-9.158
83	Q83N		-9.367	-8.796
83	Q83R		-10.728	-10.046
83	Q83S		-9.684	-10.375
83	Q83T		-8.513	-8.895
83	Q83V		-5.835	-9.834
83	Q83W		-4.968	-4.990
83	Q83Y		-4.159	-5.385
84	T84A		-14.910	-14.615
84	T84E	-7.487		-2.495
84	T84F		-9.535	-9.813
84	T84L		-40.900	-29.197
84	T84M		-12.829	-13.555
84	T84N		-11.962	-14.615
84	T84Q		-3.090	-9.272
84	T84R	-3.233		-4.782
84	T84S	-6.479	0.379	
84	T84V		-13.841	-12.432
84	T84W	1.580		-6.840
84	T84Y		-7.382	-12.328
85	E85A		-2.367	-1.892
85	E85C		0.075	-3.659
85	E85D	-7.151	2.864	
85	E85L		-1.948	-2.744
85	E85Q		-2.829	-3.430
85	E85R		-1.081	-2.952
85	E85S		-0.171	-3.368
85	E85T		-2.121	-5.655
85	E85W		-0.416	-2.994
85	E85Y		-1.283	-2.661
86	Q86G		-2.540	-1.850
86	Q86K		-1.038	-2.017
86	Q86T	-1.930	-1.657	
86	Q86V	-3.700	0.465	
86	Q86W	-4.017	0.682	
87	T87A	-11.920	1.314	
87	T87C	-18.065	0.661	
87	T87D		-7.543	-18.399
87	T87E	-5.938	0.017	

FIGURA 43O

POSIÇÃO	MUTAÇÃO	[illegible]	SUBSSRF	[illegible]
87	T87F	-21.738	-10.278	[illegible]
87	T87G	-16.102	[illegible]	[illegible]
87	T87H	-19.447	1.110	[illegible]
87	T87L	-23.665	-4.033	[illegible]
87	T87M	-8.718	-0.373	[illegible]
87	T87P	[illegible]	-12.808	-23.364
87	T87S	-4.575	0.824	[illegible]
87	T87V	-6.865	0.988	[illegible]
87	T87W	-18.829	-2.482	[illegible]
88	L88C	-6.393	[illegible]	-0.986
89	R89A	[illegible]	0.988	-8.608
89	R89G	[illegible]	-4.849	-15.112
89	R89H	-0.829	-1.094	[illegible]
89	R89L	-1.338	[illegible]	-2.594
89	R89P	0.298	[illegible]	-14.483
89	R89T	-6.247	2.090	[illegible]
89	R89V	-4.875	1.491	[illegible]
89	R89W	-3.156	0.212	[illegible]
90	Q90E	[illegible]	-2.073	-7.210
90	Q90N	-2.684	[illegible]	-0.566
90	Q90P	-7.580	[illegible]	-1.746
90	Q90W	-5.338	[illegible]	-2.664
90	Q90Y	[illegible]	-3.420	-0.007
91	I91G	-2.783	[illegible]	-7.128
91	I91L	-1.200	-3.476	[illegible]
91	I91M	-3.783	[illegible]	-17.404
91	I91S	-7.700	[illegible]	-7.495
91	I91V	[illegible]	-7.603	-4.193
91	I91Y	-130.617	[illegible]	[illegible]
92	L92A	-7.033	[illegible]	-4.009
92	L92C	-3.700	[illegible]	-1.624
92	L92G	-11.533	[illegible]	-6.119
92	L92H	-0.367	[illegible]	-8.321
92	L92N	-11.533	[illegible]	-7.404
92	L92S	-4.987	[illegible]	-0.291
92	L92T	-9.367	[illegible]	1.495
92	L92Y	-29.117	[illegible]	-11.532
93	Q93E	[illegible]	-4.032	0.119
93	Q93H	2.300	-5.460	[illegible]
93	Q93I	[illegible]	-4.984	2.321
93	Q93L	[illegible]	-3.317	0.486
93	Q93P	-48.617	[illegible]	[illegible]
93	Q93S	[illegible]	-4.190	0.761
93	Q93W	[illegible]	-3.794	-1.349
93	Q93Y	0.300	-3.000	[illegible]
94	D94E	[illegible]	-3.397	-4.284
94	D94F	[illegible]	-5.063	-1.899

FIGURA 43P

POSIÇÃO	MUTAÇÃO	[illegible]	[illegible]	[illegible]
94	D94G	[illegible]	-7.762	-4.009
94	D94H	[illegible]	-8.476	-5.385
94	D94K	[illegible]	-7.762	-3.550
94	D94N	[illegible]	-5.222	-2.725
94	D94P	-1.759	[illegible]	-2.973
94	D94Q	[illegible]	-5.063	-3.275
94	D94R	[illegible]	-7.365	-1.165
94	D94S	[illegible]	-7.603	-4.284
94	D94V	[illegible]	-6.571	0.119
95	V95F	-14.444	[illegible]	-2.010
95	V95G	-3.341	[illegible]	-0.833
95	V95L	-2.454	-0.446	[illegible]
95	V95N	-5.730	[illegible]	-1.552
95	V95Q	-9.824	[illegible]	-4.036
95	V95W	-14.919	[illegible]	[illegible]
96	K96P	-11.034	[illegible]	[illegible]
96	K96V	[illegible]	-2.117	-3.207
97	A97P	-11.793	[illegible]	-1.193
98	A98L	-0.757	-1.326	[illegible]
98	A98P	-9.850	[illegible]	-1.281
98	A98V	-1.084	[illegible]	-1.912
98	A98W	-0.383	-1.853	[illegible]
98	A98Y	-1.766	[illegible]	-1.029
99	N99D	-4.549	[illegible]	-6.029
99	N99Y	[illegible]	-2.132	-0.924
100	A100D	-7.199	[illegible]	-0.539
100	A100E	-5.283	[illegible]	-1.160
100	A100H	-7.605	1.927	[illegible]
100	A100I	-5.441	2.429	[illegible]
100	A100K	-12.555	[illegible]	[illegible]
100	A100L	-9.798	[illegible]	[illegible]
100	A100M	-7.905	2.654	[illegible]
100	A100Q	-8.669	[illegible]	2.958
100	A100R	-7.803	[illegible]	[illegible]
100	A100T	-4.549	0.827	[illegible]
100	A100V	-11.755	[illegible]	[illegible]
100	A100W	-23.755	[illegible]	-0.839
100	A100Y	-5.362	[illegible]	[illegible]
101	E101A	[illegible]	-1.919	-2.110
101	E101D	[illegible]	-1.748	-3.127
101	E101L	0.095	-1.876	[illegible]
101	E101P	-9.055	[illegible]	-16.263
101	E101T	1.245	-2.731	[illegible]
102	P102E	-12.081	[illegible]	-3.056
102	P102F	-9.305	[illegible]	-11.686
102	P102H	-12.475	[illegible]	-3.578
102	P102L	-7.436	[illegible]	0.899

FIGURA 43Q

POSIÇÃO	MUTADO			
102	P102Q	-4.706	[illegible]	-4.820
102	P102R	-10.454	[illegible]	-2.990
102	P102S	-2.255	0.132	[illegible]
102	P102W	-2.711	[illegible]	-1.487
102	P102Y	-14.505	[illegible]	-17.873
103	L103E	0.706	[illegible]	-3.054
103	L103G	[illegible]	0.635	-6.454
103	L103K	-4.458	[illegible]	-3.083
103	L103N	0.589	[illegible]	-2.413
103	L103Q	-1.164	[illegible]	-1.378
103	L103R	0.799	[illegible]	-2.617
104	L104C	-6.164	[illegible]	-1.159
104	L104P	-4.154	[illegible]	-1.276
104	L104S	-8.906	[illegible]	0.278
104	L104W	-3.547	[illegible]	-4.133
105	M105A	-0.717	-2.474	[illegible]
105	M105C	-0.822	-5.327	[illegible]
105	M105E	-6.570	[illegible]	[illegible]
105	M105G	-11.635	[illegible]	[illegible]
105	M105I	1.934	-5.712	[illegible]
105	M105L	-2.711	-4.494	[illegible]
105	M105V	-0.244	-9.269	[illegible]
106	Q106D	[illegible]	-27.635	[illegible]
106	Q106G	-7.042	0.250	[illegible]
106	Q106H	-0.927	-12.442	[illegible]
106	Q106K	-11.084	[illegible]	[illegible]
106	Q106L	1.383	-12.763	[illegible]
106	Q106M	-1.346	-8.115	[illegible]
106	Q106R	-9.142	2.750	[illegible]
106	Q106S	-8.407	0.218	[illegible]
106	Q106T	-7.776	-0.290	[illegible]
106	Q106V	-7.173	-2.763	[illegible]
106	Q106W	[illegible]	-34.141	[illegible]
106	Q106Y	-8.150	-0.092	[illegible]
107	I107C	-1.534	0.799	[illegible]
107	I107E	-4.030	[illegible]	[illegible]
107	I107G	-1.332	-1.499	[illegible]
107	I107K	-3.634	[illegible]	-5.054
107	I107L	-3.000	1.239	[illegible]
107	I107M	-1.049	0.068	[illegible]
107	I107Q	-3.567	2.070	[illegible]
107	I107S	-29.598	[illegible]	0.798
107	I107Y	[illegible]	-5.114	-0.752
108	R108A	[illegible]	-6.028	[illegible]
108	R108C	2.405	-4.806	[illegible]
108	R108D	[illegible]	-8.381	[illegible]
108	R108E	[illegible]	-5.423	0.965

FIGURA 43R

POSIÇÃO	MUTAÇÃO			
108	R108F	[illegible]	-4.120	-2.370
108	R108G	[illegible]	-2.682	0.611
108	R108H	[illegible]	-5.713	0.507
108	R108I	[illegible]	-7.874	[illegible]
108	R108L	[illegible]	-8.683	[illegible]
108	R108M	[illegible]	-4.409	1.742
108	R108R	[illegible]	-2.983	-2.668
108	R108S	2.814	-5.409	[illegible]
108	R108V	1.613	-5.353	[illegible]
108	R108W	[illegible]	-6.954	-11.813
108	R108Y	[illegible]	-5.582	[illegible]
109	L109A	[illegible]	-7.405	-5.849
109	L109C	1.708	-3.847	[illegible]
109	L109D	[illegible]	-5.175	-8.314
109	L109E	[illegible]	-7.238	-9.229
109	L109F	[illegible]	-8.122	1.663
109	L109G	[illegible]	-4.806	-0.203
109	L109K	[illegible]	-7.378	1.626
109	L109M	-1.997	0.453	[illegible]
109	L109P	[illegible]	-7.249	-6.584
109	L109Q	-2.254	-0.032	[illegible]
109	L109R	[illegible]	-6.685	1.118
109	L109S	[illegible]	-6.714	-6.843
109	L109T	2.715	-5.509	[illegible]
109	L109V	2.162	-4.505	[illegible]
109	L109Y	[illegible]	-8.370	[illegible]
110	P110A	2.679	-6.318	[illegible]
110	P110C	[illegible]	-7.316	0.470
110	P110D	[illegible]	-6.316	0.528
110	P110E	[illegible]	-5.151	0.936
110	P110F	[illegible]	-12.603	-4.795
110	P110G	[illegible]	-5.018	1.243
110	P110H	[illegible]	-7.456	[illegible]
110	P110K	[illegible]	-8.246	0.084
110	P110L	[illegible]	-6.901	-0.814
110	P110M	[illegible]	-6.690	0.271
110	P110N	[illegible]	-10.958	[illegible]
110	P110R	[illegible]	-11.231	[illegible]
110	P110S	[illegible]	-6.653	1.617
110	P110V	[illegible]	-6.814	[illegible]
110	P110W	[illegible]	-10.612	-1.435
111	A111C	[illegible]	-13.170	-4.264
111	A111E	[illegible]	-0.045	-5.452
111	A111L	[illegible]	-9.844	1.347
111	A111M	[illegible]	-1.287	0.262
111	A111P	[illegible]	-2.263	0.578
111	A111Q	[illegible]	-2.121	-2.152

FIGURA 43S

POSIÇÃO	MUTAÇÃO	[illegible]	[illegible]	[illegible]
111	A111V	2.767	-7.589	[illegible]
111	A111Y	[illegible]	-0.775	-0.868
112	N112A	-7.410	-4.888	[illegible]
112	N112F	-4.527	-2.871	[illegible]
112	N112G	-6.119	-0.915	[illegible]
112	N112I	-4.954	-11.138	[illegible]
112	N112K	[illegible]	-7.746	0.620
112	N112L	-7.258	-10.647	[illegible]
112	N112P	-5.663	-6.719	[illegible]
112	N112R	[illegible]	-0.296	-0.461
112	N112V	-5.309	-10.022	[illegible]
112	N112W	-10.220	-6.585	[illegible]
112	N112Y	-11.461	-4.286	[illegible]
113	Y113A	-6.094	0.223	[illegible]
113	Y113C	[illegible]	-6.585	-5.749
113	Y113D	-7.587	[illegible]	[illegible]
113	Y113M	1.071	-3.906	[illegible]
113	Y113W	-17.785	-0.784	[illegible]
114	G114F	-14.414	-1.098	[illegible]
114	G114L	-8.575	0.558	[illegible]
114	G114M	-11.511	1.004	[illegible]
114	G114P	[illegible]	-0.057	-1.263
114	G114W	-18.493	-0.453	[illegible]
114	G114Y	-13.511	0.335	[illegible]
115	R115A	2.071	-21.595	[illegible]
115	R115C	1.509	-13.387	[illegible]
115	R115E	2.970	-22.000	[illegible]
115	R115G	-14.783	-18.936	[illegible]
115	R115I	-1.375	-10.092	[illegible]
115	R115N	-6.805	-4.486	[illegible]
115	R115P	-3.772	-2.867	[illegible]
115	R115Q	-1.375	-3.792	[illegible]
115	R115S	-4.258	-5.757	[illegible]
115	R115V	-0.588	-4.659	[illegible]
115	R115W	[illegible]	-3.737	2.823
115	R115Y	-6.393	-15.584	[illegible]
116	R116D	[illegible]	-3.561	-1.707
116	R116E	[illegible]	-2.058	-2.707
116	R116H	-2.873	-4.370	[illegible]
116	R116V	0.311	-6.393	[illegible]
116	R116W	-15.532	-15.410	[illegible]
117	Y117A	[illegible]	-0.333	-0.960
117	Y117C	[illegible]	0.948	-4.397
117	Y117E	[illegible]	-1.374	-0.748
117	Y117H	-7.404	[illegible]	2.052
117	Y117L	-6.393	[illegible]	1.397
117	Y117M	-11.749	[illegible]	[illegible]

FIGURA 43T

POSIÇÃO	MUTAÇÃO	[illegible]	[illegible]	[illegible]
117	Y117N	-3.397	[illegible]	-0.052
117	Y117Q	[illegible]	-0.448	-1.022
117	Y117R	[illegible]	0.284	-1.554
117	Y117T	[illegible]	2.220	-7.707
117	Y117V	[illegible]	0.023	-9.328
117	Y117W	-24.071	-3.272	[illegible]
118	N118A	-0.663	-9.399	[illegible]
118	N118C	[illegible]	-25.526	[illegible]
118	N118E	0.086	-15.410	[illegible]
118	N118G	[illegible]	-17.838	[illegible]
118	N118H	-9.764	-9.977	[illegible]
118	N118I	[illegible]	-47.665	[illegible]
118	N118K	[illegible]	1.699	-8.569
118	N118L	-5.157	-26.509	[illegible]
118	N118M	-6.955	-6.335	[illegible]
118	N118P	-4.371	-30.902	[illegible]
118	N118Q	2.933	-12.289	[illegible]
118	N118S	[illegible]	-0.526	0.013
118	N118T	[illegible]	-44.197	[illegible]
118	N118V	[illegible]	-54.081	[illegible]
118	N118W	[illegible]	-24.023	[illegible]
119	E119C	[illegible]	-4.613	1.487
119	E119D	1.897	-3.588	[illegible]
119	E119F	0.766	-3.860	[illegible]
119	E119G	[illegible]	-5.115	1.026
119	E119K	-0.810	-4.215	[illegible]
119	E119M	[illegible]	-4.257	1.816
119	E119P	0.442	-13.546	[illegible]
119	E119R	-0.547	-4.843	[illegible]
119	E119W	-0.184	-5.722	[illegible]
119	E119Y	1.695	-5.052	[illegible]
120	A120D	[illegible]	-2.918	-1.605
120	A120E	[illegible]	-0.130	-0.382
120	A120G	-0.386	-2.228	[illegible]
120	A120I	-5.537	0.743	[illegible]
120	A120L	-0.527	-0.931	[illegible]
120	A120T	-1.982	0.847	[illegible]
120	A120W	-6.143	-2.981	[illegible]
121	F121A	[illegible]	-25.847	[illegible]
121	F121C	-0.022	-12.312	[illegible]
121	F121D	[illegible]	-30.262	[illegible]
121	F121E	[illegible]	-25.052	[illegible]
121	F121K	-9.116	-2.226	[illegible]
121	F121L	-11.497	-11.203	[illegible]
121	F121M	[illegible]	-13.839	[illegible]
121	F121P	[illegible]	-26.203	[illegible]
121	F121Q	[illegible]	-19.111	[illegible]

FIGURA 43U

POSIÇÃO	MUTAÇÃO	[illegible]	[illegible]	[illegible]
121	F121R	[illegible]	-25.554	[illegible]
121	F121S	[illegible]	-22.772	[illegible]
121	F121Y	[illegible]	-11.036	[illegible]
122	S122A	0.160	-4.467	[illegible]
122	S122C	-1.214	-3.985	[illegible]
122	S122D	[illegible]	-5.248	[illegible]
122	S122E	[illegible]	-19.592	[illegible]
122	S122F	-4.952	-3.504	[illegible]
122	S122G	-1.154	-6.182	[illegible]
122	S122I	-7.962	[illegible]	[illegible]
122	S122L	-8.042	-4.320	[illegible]
122	S122P	-3.658	-10.115	[illegible]
122	S122V	-7.739	1.015	[illegible]
122	S122W	-5.941	-5.659	[illegible]
122	S122Y	-6.931	-3.337	[illegible]
123	A123F	-5.958	-0.357	[illegible]
123	A123T	-10.509	2.225	[illegible]
123	A123V	-3.817	-0.031	[illegible]
123	A123W	-4.095	-0.373	[illegible]
123	A123Y	-10.030	-2.335	[illegible]
124	I124A	-5.925	1.023	[illegible]
124	I124C	-3.568	-0.943	[illegible]
124	I124G	-36.078	[illegible]	[illegible]
124	I124H	-2.221	[illegible]	-2.310
124	I124K	-8.107	[illegible]	1.537
124	I124L	-2.997	-0.473	[illegible]
124	I124R	-3.539	[illegible]	-0.631
124	I124S	1.707	[illegible]	-6.213
124	I124T	[illegible]	-15.577	-21.006
124	I124Y	-60.150	[illegible]	[illegible]
125	Y125C	[illegible]	-28.984	[illegible]
125	Y125F	-0.389	-7.830	[illegible]
125	Y125G	[illegible]	-11.556	[illegible]
125	Y125I	-28.114	-11.401	[illegible]
125	Y125L	-1.665	-11.584	[illegible]
125	Y125P	[illegible]	-9.803	[illegible]
125	Y125Q	-26.916	-3.654	[illegible]
125	Y125R	-68.533	[illegible]	[illegible]
125	Y125S	[illegible]	-49.313	[illegible]
125	Y125T	-12.485	-12.995	[illegible]
125	Y125V	[illegible]	-24.588	[illegible]
125	Y125W	[illegible]	-9.533	-0.310
126	P126C	-60.210	[illegible]	[illegible]
126	P126F	-4.940	[illegible]	-1.538
126	P126R	[illegible]	2.280	-10.237
126	P126T	[illegible]	-5.247	-2.722
126	P126V	[illegible]	-1.346	-3.195

FIGURA 43V

POSIÇÃO	MUTAÇÃO	[illegible]	[illegible]	[illegible]
127	K127I	-0.569	[illegible]	-2.840
127	K127P	-1.202	[illegible]	-5.867
127	K127S	[illegible]	-1.002	-5.753
128	L128A	0.269	[illegible]	-8.047
128	L128C	[illegible]	-0.192	-9.053
128	L128S	-0.030	[illegible]	-10.296
128	L128T	[illegible]	[illegible]	-12.663
128	L128V	[illegible]	-0.884	-6.171
129	A129H	-4.820	[illegible]	0.651
129	A129I	-4.439	[illegible]	-3.852
129	A129K	-11.287	[illegible]	1.065
129	A129N	-6.557	[illegible]	-2.959
129	A129W	-5.944	[illegible]	-8.947
129	A129Y	-6.852	[illegible]	-7.084
130	K130E	[illegible]	-3.927	0.407
130	K130I	[illegible]	-3.434	0.000
130	K130P	-2.893	[illegible]	-4.232
130	K130V	[illegible]	-2.500	-3.491
131	E131A	-4.419	[illegible]	1.541
131	E131C	-6.547	[illegible]	0.395
131	E131F	-6.074	[illegible]	1.478
131	E131G	-4.926	[illegible]	-6.548
131	E131I	-6.277	2.568	[illegible]
131	E131K	-4.641	[illegible]	0.769
131	E131L	-5.770	[illegible]	[illegible]
131	E131N	-5.359	[illegible]	-0.178
131	E131V	-5.534	[illegible]	2.242
131	E131W	-4.622	[illegible]	-1.962
132	F132D	[illegible]	1.596	-9.860
132	F132E	[illegible]	-3.049	-4.911
132	F132N	[illegible]	0.684	-7.567
132	F132T	[illegible]	0.137	-6.930
133	D133R	[illegible]	-2.665	-0.414
133	D133S	[illegible]	-3.654	0.533
133	D133T	[illegible]	-3.984	1.302
133	D133V	[illegible]	-2.445	-0.828
134	V134D	-21.228	[illegible]	-5.325
134	V134E	-7.814	[illegible]	-3.077
134	V134I	[illegible]	-3.602	-1.771
134	V134K	-0.365	[illegible]	-7.694
134	V134M	[illegible]	0.632	-6.450
134	V134N	-0.736	[illegible]	-5.465
134	V134Q	-1.277	[illegible]	-7.312
134	V134R	-1.750	[illegible]	-7.694
134	V134W	-26.198	[illegible]	-10.178
134	V134Y	-10.928	[illegible]	-3.254
136	L136A	-7.528	[illegible]	1.185

FIGURA 43X

POSIÇÃO	MUTAÇÃO	[illegible]	[illegible]	[illegible]
136	L136C	-6.018	-0.852	[illegible]
136	L136D	-9.614	[illegible]	0.628
136	L136E	-5.846	[illegible]	0.598
136	L136F	-4.136	[illegible]	0.070
136	L136G	-10.658	[illegible]	1.889
136	L136H	-3.933	[illegible]	-1.367
136	L136K	-6.600	[illegible]	-4.358
136	L136M	-0.449	-7.500	[illegible]
136	L136N	-3.296	[illegible]	-2.628
136	L136P	-8.426	[illegible]	-5.824
136	L136Q	-18.174	[illegible]	[illegible]
136	L136R	-4.948	[illegible]	-2.540
136	L136S	-21.766	[illegible]	[illegible]
136	L136T	-7.788	[illegible]	2.592
137	L137E	-4.281	[illegible]	-7.026
137	L137G	-3.962	[illegible]	-0.164
137	L137H	-8.165	[illegible]	-2.921
137	L137P	-9.383	[illegible]	[illegible]
137	L137Q	-7.528	[illegible]	-2.246
137	L137S	-10.658	[illegible]	1.390
137	L137Y	-5.528	[illegible]	1.625
138	P138E	[illegible]	-6.985	[illegible]
138	P138N	[illegible]	-10.809	-3.713
138	P138R	[illegible]	-12.868	[illegible]
138	P138T	[illegible]	-10.279	[illegible]
138	P138V	[illegible]	-8.750	0.217
139	F139A	[illegible]	-9.939	-12.583
139	F139D	[illegible]	-13.350	-28.446
139	F139G	[illegible]	-11.047	-4.964
139	F139H	[illegible]	-18.248	-15.173
139	F139M	[illegible]	-10.551	[illegible]
139	F139S	[illegible]	-11.207	-13.923
139	F139W	[illegible]	-0.967	-0.962
140	F140C	[illegible]	-12.504	-7.315
140	F140G	[illegible]	-21.615	-10.857
140	F140M	[illegible]	-6.484	-3.060
140	F140N	[illegible]	-12.504	-10.440
140	F140P	[illegible]	-14.254	-6.929
140	F140S	[illegible]	-17.402	2.565
141	M141A	[illegible]	-17.373	-11.512
141	M141C	[illegible]	-16.863	-9.250
141	M141D	[illegible]	-26.367	-23.714
141	M141E	[illegible]	-29.516	-25.054
141	M141F	[illegible]	-2.686	-1.501
141	M141G	[illegible]	-13.277	-13.179
141	M141K	[illegible]	-31.601	-23.982
141	M141L	[illegible]	-23.350	-12.077

FIGURA 43Z

POSIÇÃO	MUTAÇÃO	[illegible]	-21.397	-10.738
141	M141P	[illegible]	-28.598	-19.101
141	M141Q	[illegible]	-2.332	-1.309
141	M141R	[illegible]	-26.878	-21.244
141	M141T	[illegible]	-0.867	-0.696
141	M141V	[illegible]	-37.388	-36.482
141	M141W	[illegible]	-4.050	-1.834
141	M141Y	[illegible]	-15.609	[illegible]
142	E142A	[illegible]	-11.688	2.179
142	E142C	-5.095	-5.857	[illegible]
142	E142L	-6.139	-1.163	[illegible]
142	E142M	0.451	-2.854	[illegible]
142	E142N	[illegible]	-20.566	[illegible]
142	E142P	[illegible]	-14.414	[illegible]
142	E142Q	1.892	-10.974	[illegible]
142	E142S	[illegible]	-10.595	-4.994
142	E142W	[illegible]	-12.563	[illegible]
142	E142Y	-0.176	-1.331	[illegible]
143	E143I	-1.049	-0.495	[illegible]
143	E143P	[illegible]	-1.002	-1.005
144	V144D	[illegible]	-0.983	-0.994
144	V144E	[illegible]	-1.149	-0.882
144	V144G	[illegible]	-4.731	-4.312
144	V144H	[illegible]	-0.926	-0.946
144	V144N	[illegible]	-3.760	-3.706
144	V144P	[illegible]	-4.232	-4.280
144	V144Q	[illegible]	-4.254	-4.460
144	V144R	[illegible]	-3.958	-3.648
144	V144S	[illegible]	-5.435	-3.976
144	V144W	[illegible]	-3.786	-1.919
144	V144Y	[illegible]	-4.427	-4.222
145	Y145D	[illegible]	-3.921	-4.165
145	Y145E	[illegible]	-1.079	-1.181
145	Y145I	[illegible]	-5.844	-4.960
145	Y145L	[illegible]	-5.521	-3.911
145	Y145M	[illegible]	-4.090	-2.025
145	Y145Q	[illegible]	-4.363	-4.402
145	Y145T	[illegible]	-1.035	-0.331
145	Y145W	[illegible]	-6.436	-4.857
147	K147G	[illegible]	-13.093	-10.453
147	K147P	-2.386	0.133	[illegible]
147	K147R	[illegible]	-6.162	-4.184
147	K147W	[illegible]	-0.621	-6.375
148	P148D	[illegible]	-0.504	-6.137
148	P148E	-1.846	-0.230	[illegible]
148	P148W	[illegible]	-17.412	-4.912
150	W150C	[illegible]	-67.695	-20.400
150	W150D	[illegible]		

FIGURA 43A'

POSIÇÃO	MUTAÇÃO			
150	W150E	[illegible]	-45.435	-18.400
150	W150G	[illegible]	-7.412	2.763
150	W150L	[illegible]	-7.017	-0.074
150	W150Q	[illegible]	-27.638	-9.656
150	W150T	[illegible]	-27.638	0.949
151	M151A	[illegible]	-9.579	-1.495
151	M151C	[illegible]	-8.997	0.805
151	M151E	[illegible]	-11.230	-2.970
151	M151F	[illegible]	-1.559	-0.507
151	M151G	[illegible]	-8.155	-4.597
151	M151I	[illegible]	-12.805	0.978
151	M151Q	[illegible]	-7.121	[illegible]
151	M151S	[illegible]	-9.319	-3.490
151	M151T	[illegible]	-8.442	2.302
151	M151V	[illegible]	-14.853	-1.126
151	M151W	[illegible]	-18.538	-9.499
152	Q152A	-28.877	[illegible]	[illegible]
152	Q152D	[illegible]	[illegible]	-16.260
152	Q152E	-1.960	[illegible]	-9.377
152	Q152F	[illegible]	-12.045	-19.005
152	Q152H	-19.405	[illegible]	-10.493
152	Q152I	[illegible]	-17.356	-21.935
152	Q152K	-28.260	[illegible]	[illegible]
152	Q152L	[illegible]	-28.994	-13.284
152	Q152R	-0.286	[illegible]	-12.307
152	Q152S	-3.458	0.667	[illegible]
152	Q152T	[illegible]	-17.017	-18.726
152	Q152Y	-19.185	[illegible]	-10.726
156	I156C	-11.137	-3.481	[illegible]
156	I156F	-20.314	-1.126	[illegible]
156	I156L	[illegible]	-12.287	-6.370
156	I156Q	-4.765	-5.965	[illegible]
156	I156R	-11.137	-7.481	[illegible]
156	I156S	-11.564	-7.932	[illegible]
158	P158A	[illegible]	-9.674	-0.454
158	P158F	[illegible]	-65.116	-30.085
158	P158G	-1.503	-1.061	[illegible]
158	P158H	[illegible]	-18.739	-24.309
158	P158I	[illegible]	-27.076	-14.134
158	P158L	[illegible]	-53.754	-18.385
158	P158Q	[illegible]	-20.266	-20.449
158	P158S	-6.099	1.794	[illegible]
158	P158T	[illegible]	-8.306	-8.911
158	P158V	[illegible]	-40.233	-20.449
159	N159C	[illegible]	-3.322	-2.960
159	N159E	[illegible]	1.487	-10.683
159	N159G	-0.832	-2.545	[illegible]

FIGURA 43B'

POSIÇÃO	MUTAÇÃO	[illegible]	[illegible]	[illegible]
159	N159I	[illegible]	-13.189	-8.951
159	N159K	[illegible]	-2.932	-3.431
159	N159L	[illegible]	-0.674	-8.546
159	N159M	[illegible]	0.532	-6.279
159	N159Q	0.814	[illegible]	-4.653
159	N159R	[illegible]	-3.887	-0.652
159	N159T	[illegible]	-8.306	-4.538
159	N159V	[illegible]	-8.173	-7.413
160	R160A	[illegible]	-7.094	-4.500
160	R160C	[illegible]	-1.140	-5.209
160	R160D	[illegible]	-6.335	-10.830
160	R160E	[illegible]	-3.793	-7.627
160	R160G	[illegible]	-4.380	-7.758
160	R160H	[illegible]	-3.486	-3.902
160	R160N	[illegible]	-3.674	-1.485
160	R160Q	[illegible]	-4.513	-4.042
160	R160S	[illegible]	-6.126	-4.538
161	D161E	[illegible]	-2.857	-0.490
161	D161K	1.024	-3.223	[illegible]
161	D161N	-2.357	-0.352	[illegible]
161	D161R	1.495	-3.887	[illegible]
161	D161S	-1.241	-2.093	[illegible]
161	D161V	-0.344	-3.090	[illegible]
161	D161W	-0.392	-3.953	[illegible]
162	A162G	-6.020	[illegible]	[illegible]
162	A162I	[illegible]	-12.592	-16.386
162	A162L	[illegible]	-32.508	-25.536
162	A162T	[illegible]	-11.531	-6.908
162	A162V	[illegible]	-4.513	0.118
162	A162Y	[illegible]	-24.547	-29.719
163	Q163A	-7.019	[illegible]	2.920
163	Q163C	-3.679	[illegible]	-4.156
163	Q163G	-5.180	1.692	[illegible]
163	Q163L	-2.460	0.436	[illegible]
163	Q163S	-6.777	0.745	[illegible]
163	Q163T	-9.289	[illegible]	-3.757
164	P164C	-3.585	-0.626	[illegible]
165	F165D	[illegible]	-4.668	-4.721
165	F165E	[illegible]	-3.493	-1.631
165	F165G	[illegible]	-4.056	2.156
165	F165I	[illegible]	-17.771	-8.202
165	F165K	[illegible]	-8.775	-5.850
165	F165L	[illegible]	-0.465	-6.349
165	F165M	[illegible]	-6.874	-6.050
165	F165R	[illegible]	-9.467	-3.425
165	F165S	[illegible]	-4.121	-1.033
165	F165T	[illegible]	-9.225	-6.781

FIGURA 43C'

Posição	Mutação	[illegible]	[illegible]	[illegible]
165	F165V	[illegible]	-6.858	-6.515
165	F165W	-2.723	-3.448	[illegible]
166	I166F	[illegible]	-30.900	-10.263
166	I166L	[illegible]	-11.481	2.065
166	I166M	[illegible]	-6.223	0.805
167	A167C	[illegible]	2.000	-4.993
167	A167E	-3.668	[illegible]	-1.714
167	A167F	2.286	[illegible]	-15.878
167	A167G	-1.869	[illegible]	-1.981
167	A167K	-7.595	[illegible]	-5.673
167	A167L	-4.976	[illegible]	-14.585
167	A167M	[illegible]	-2.803	-0.721
167	A167N	-16.524	[illegible]	-11.796
167	A167Q	-7.833	[illegible]	-7.646
167	A167R	[illegible]	[illegible]	-9.687
167	A167T	[illegible]	-7.060	-3.565
167	A167V	0.738	[illegible]	-8.122
167	A167Y	-1.107	[illegible]	-6.294
168	D168L	-16.048	[illegible]	1.605
168	D168P	[illegible]	-55.287	[illegible]
168	D168V	-7.000	[illegible]	0.993
168	D168W	-4.738	[illegible]	-0.776
169	W169A	-6.365	0.702	[illegible]
169	W169D	-7.402	[illegible]	-1.283
169	W169E	-3.004	-0.617	[illegible]
169	W169G	-7.527	[illegible]	2.395
169	W169K	-1.442	-9.900	[illegible]
169	W169M	-5.079	1.163	[illegible]
169	W169Q	-2.921	-2.365	[illegible]
169	W169R	-4.000	-3.009	[illegible]
169	W169S	-3.627	-0.064	[illegible]
169	W169T	-2.204	-3.868	[illegible]
169	W169V	-0.345	-3.610	[illegible]
170	M170A	-0.832	-3.029	[illegible]
170	M170F	[illegible]	-4.006	-1.590
170	M170G	-3.962	[illegible]	-0.169
170	M170H	[illegible]	-4.788	0.108
170	M170L	[illegible]	-3.347	-0.520
170	M170N	-5.711	[illegible]	-1.262
170	M170Q	-13.710	[illegible]	-9.668
170	M170S	-5.041	[illegible]	-0.005
170	M170T	[illegible]	2.198	-10.060
170	M170V	1.052	-4.130	[illegible]
170	M170W	-12.257	[illegible]	-0.475
170	M170Y	[illegible]	-2.887	0.466
171	A171E	[illegible]	-1.322	-1.552
171	A171F	[illegible]	-1.567	-2.179

FIGURA 43D'

POSIÇÃO	MUTAÇÃO	[illegible]	[illegible]	[illegible]
171	A171I	0.265	-2.216	[illegible]
171	A171V	[illegible]	-2.365	0.063
171	A171W	[illegible]	-3.715	-2.224
172	K172A	[illegible]	-0.463	-3.614
172	K172M	[illegible]	-2.825	-2.135
172	K172P	-11.469	[illegible]	-1.552
173	Q173N	0.469	-3.667	[illegible]
173	Q173W	-2.314	-0.079	[illegible]
173	Q173Y	-0.479	-1.102	[illegible]
174	L174A	-5.962	[illegible]	-6.778
174	L174F	-3.087	[illegible]	-1.262
174	L174G	2.067	[illegible]	-12.791
174	L174Q	-11.267	-17.425	[illegible]
174	L174T	-5.267	[illegible]	-2.007
174	L174W	-6.644	[illegible]	[illegible]
176	P176H	-0.434	-2.463	[illegible]
176	P176L	-1.717	-0.549	[illegible]
177	L177D	-0.977	[illegible]	-7.366
177	L177G	-1.006	[illegible]	-5.928
177	L177M	[illegible]	-1.028	-4.558
177	L177T	[illegible]	-2.899	-0.438
178	V178A	-1.717	-0.673	[illegible]
178	V178W	[illegible]	-4.685	1.197
179	N179G	[illegible]	-0.720	-1.281
179	N179V	[illegible]	-3.342	1.391
179	N179Y	[illegible]	-1.414	-0.923
180	H180E	[illegible]	-1.825	-1.997
180	H180R	[illegible]	-2.879	0.207
181	D181A	1.694	-3.574	[illegible]
181	D181H	[illegible]	-3.316	1.253
181	D181Q	0.644	-2.494	[illegible]
181	D181S	0.003	-2.185	[illegible]
181	D181W	1.606	-4.160	[illegible]
182	S182A	1.111	-2.895	[illegible]
182	S182E	-0.551	-1.630	[illegible]
182	S182I	-0.638	-2.031	[illegible]
182	S182K	-2.644	-1.270	[illegible]

FIGURA 44A

Mutações que aumentam % de Ester	
MUTAÇÃO	Pontuação Z
A1R	5.03
D2H	4.09
D2R	3.60
L4G	5.04
L4M	3.47
L5Q	3.20
I6A	4.33
I6L	5.83
L7E	6.00
G8A	3.98
S12N	4.13
A13I	4.23
A13L	7.83
A13S	8.38
A13T	11.78
A13W	3.67
A13Y	6.66
G14K	4.45
G14R	4.70
G14S	5.27
G14T	3.50
A22D	4.29
A22E	3.44
A22H	3.34
A22Y	9.47
W23Y	7.30
P24C	5.98
P24G	5.08
P24T	5.11
A25P	3.19
L26C	6.61
L26D	3.91
L26E	3.56
L26G	3.09
L26N	4.91
N28A	4.17
N28M	4.76
D29V	3.50
S33G	3.89
S33M	6.90
K34A	3.82

FIGURA 44B

K34H	4.00
K34M	4.59
T35G	7.42
T35M	4.77
S36A	5.89
V37A	3.32
V37G	12.12
V37H	6.80
V37S	6.18
V38D	3.78
V38G	3.04
V38P	7.99
N39E	8.55
N39Q	10.27
N39R	8.30
A40M	8.09
A40P	4.48
S41T	3.18
G44F	15.32
G44Y	18.61
D45P	7.22
D45Q	6.10
T46W	5.89
S47F	11.65
Q49I	3.53
G50A	4.02
G50K	8.94
G50M	7.53
G50S	4.66
R53S	3.50
L58D	4.15
L58M	4.67
L58R	4.08
W65L	4.97
L67G	5.61
V68G	6.96
V68M	5.55
V68N	3.76
E69P	7.37
E69Q	4.96
L70A	3.26
L70E	5.28
L70H	6.20
G71C	5.41
G72A	8.49

FIGURA 44C

N73C	43.13
N73G	20.82
N73L	99.80
N73R	55.92
N73T	21.73
N73V	23.14
D74C	3.40
D74S	6.08
D74W	3.06
G75A	5.56
G75K	9.24
G75L	4.21
G75M	5.22
L76A	8.09
L76F	6.06
L76G	9.97
L76I	12.96
L76M	8.95
L76N	7.26
L76T	8.29
L76W	3.88
R77G	3.68
F79A	4.32
F79M	3.53
F79P	5.17
P81E	3.67
P81W	9.66
T84F	3.46
T84H	6.48
T84Y	5.60
Q86P	5.77
Q86W	3.12
T87M	5.05
T87S	10.43
T87W	6.37
L88C	4.90
L88F	4.64
L88G	5.68
L88H	5.96
L88Y	6.92
R89G	3.31
Q90P	5.13
Q90W	4.08
I91M	3.07
I91S	3.57

FIGURA 44D

L92C	3.80
L92G	3.16
Q93F	3.11
Q93P	4.58
V95A	4.03
V95D	12.50
V95E	5.71
V95L	4.40
V95M	5.04
K96P	4.05
N99L	3.35
N99M	4.20
N99S	4.70
A100D	3.22
A100K	4.15
A100L	7.81
A100M	4.13
A100V	3.06
A100Y	4.65
L103A	6.13
L104A	15.18
L104C	5.30
L104P	4.74
L104Q	9.63
L104W	10.14
M105A	5.23
Q106A	5.08
Q106C	3.89
Q106T	4.25
Q106W	3.32
I107C	3.47
I107M	3.01
R108E	4.03
L109F	6.41
L109M	3.71
G114F	3.10
R115W	3.53
Y117P	3.67
E119D	3.15
E119P	3.57
A120P	3.78
F121A	5.76
F121C	3.24
F121W	3.48
K127P	3.78

FIGURA 44E

L128F	3.52
A129L	3.29
A129Y	3.90
E131A	3.45
F132P	4.96
V134P	5.07
P135A	5.45
L136A	6.42
F139M	4.10
M141A	5.51
M141P	5.32
E142A	3.32
E143P	3.02
V144A	3.51
W150D	7.23
W150E	3.06
M151S	3.79
G155V	5.25
I156K	5.55
I156M	3.06
P158A	5.79
P158G	10.16
P158Q	3.77
P158S	4.57
N159E	3.77
N159I	5.22
R160H	3.92
R160I	5.09
R160K	5.34
D161G	4.10
A162T	3.68
A162Y	8.66
Q163A	7.29
Q163C	7.72
Q163E	5.85
Q163G	11.71
Q163I	9.28
Q163M	4.29
Q163S	4.82
Q163T	3.00
Q163V	6.11
P164C	12.04
F165D	3.42
F165S	3.30
I166A	3.85

FIGURA 44F

I166L	3.59
W169M	3.29
M170E	3.05
M170G	9.99
M170N	8.03
M170S	7.12
Q173P	3.78
L174A	3.78

FIGURA 45A

Mutações que reduzem % de Ester	
MUTAÇÃO	Pontuação Z
T3E	-3.75
T3G	-3.15
T3K	-4.44
T3L	-5.16
L5C	-3.52
L5G	-7.94
Y15A	-9.80
Y15L	-7.41
Y15Q	-9.62
Y15R	-12.86
Y15V	-5.13
R16D	-5.44
R16E	-7.34
R16G	-5.66
R16I	-5.18
R16V	-4.68
S18E	-3.37
L27V	-4.40
N28G	-3.88
N28I	-4.84
S33I	-3.77
S33R	-4.67
K34R	-6.85
T35F	-3.95
T35K	-4.93
T35L	-5.21
T35Q	-6.00
T35V	-4.28
S36F	-3.06
S36I	-3.20
S36L	-4.70
S36W	-3.22
V37L	-7.70
V38E	-3.29
V38F	-3.81
V38K	-5.68
V38L	-4.19
A40D	-3.30
A40G	-7.18
I42T	-3.61
T46L	-3.27

FIGURA 45B

L57A	-4.83
L57F	-4.37
L57G	-4.12
L57H	-6.58
L57K	-5.98
L57N	-5.05
L57P	-5.74
L57R	-5.38
L57S	-6.16
L57T	-4.19
L57V	-4.08
L57W	-3.71
L57Y	-5.01
K59V	-4.45
Q60E	-3.55
Q60P	-3.08
Q62G	-4.53
W65V	-4.41
V68L	-7.42
R77L	-3.91
G78M	-4.30
V95F	-3.85
V95N	-3.33
K96C	-4.65
K96L	-3.67
K96N	-4.18
K96Q	-5.36
K96R	-7.65
K96Y	-5.38
A97E	-4.36
A97F	-4.27
A97R	-4.60
A97W	-5.12
A98E	-3.70
N99A	-4.21
N99D	-3.30
A100S	-4.38
P102I	-3.39
L103Q	-3.11
L103W	-3.89
M105L	-3.83
Q106G	-5.28
Q106H	-5.37
Q106K	-3.30
Q106S	-4.63

FIGURA 45C

Q106V	-5.60
F121P	-3.07
A123E	-4.90
Q152D	-4.56
Q152E	-9.86
Q152F	-11.08
Q152H	-12.47
Q152I	-8.55
Q152K	-6.37
Q152L	-7.44
Q152S	-5.03
Q152T	-7.31
Q152Y	-14.60
D153P	-4.17
D153V	-4.45
D154E	-3.11
A167V	-3.05
Q175L	-3.76
P176D	-3.67
V178K	-3.94
N179H	-3.14
N179W	-5.01
H180E	-3.01
H180L	-3.82
H180P	-3.19
H180R	-5.37
D181C	-3.81
D181E	-3.98
S182K	-5.10
S182L	-9.96
S182N	-3.24
S182R	-3.03
S182T	-3.14
S182V	-4.94

FIGURA 46A

Mutação	Z-Score de derivado de ácido graxo total
D2L	3.1
D2P	3.09
D2R	5.27
L5G	9.06
L11I	10.41
S12N	19.35
S12T	5.24
A13N	9.86
G14C	10.55
G14P	3.91
G14S	11.7
G14T	15.3
G14V	10.24
Y15C	15.73
Y15I	4.12
Y15V	14.38
R16T	10.83
M17D	5.66
M17E	13.02
M17N	12.67
M17R	8.13
M17S	17.91
M17V	14.03
A19C	8.28
A21G	3.99
A22L	8.35
A22R	9.85
A22T	11.82
A25P	4.3
L26D	6.02
L26G	5.13
L26W	3.97
L27C	18.8
L27F	4.85
L27W	4.46
L27Y	17.6
N28I	3.54
N28P	10.46

FIGURA 46B

D29P	4.5
K30P	4.51
W31D	3.34
W31G	3.44
W31N	7.18
W31P	9.84
W31R	8.12
W31S	5.62
W31T	3.45
V37Y	3.31
N39P	4.07
S41C	6.16
I42D	3.81
I42G	5.49
S43E	5.31
G44K	4.38
G44R	5.74
G44W	4.52
D45G	2.99
Q49E	5.84
G50A	4.07
G50K	3.41
G50M	5.65
G50Q	3.87
L51D	7.74
L51T	3.23
R53A	14.19
R53G	19.1
R53L	3.99
R53N	19.72
R53S	10.86
R53V	8.46
L54E	10.38
L54F	7.61
L54G	16.55
L54N	18.34
L54S	6.45
L54W	7.15
L56R	4.52
P63G	3.98
P63M	3.85

FIGURA 46C

P63N	4.85
P63T	3.32
P63W	3.16
W65E	3.44
W65G	3.87
V66G	3.15
V66S	5.47
L67T	2.95
V68S	3.59
E69F	4.13
E69V	6.21
L70C	12.11
L70F	6.04
L70Q	6.61
L70S	9.83
L70T	6.68
L70V	3.8
G71A	10.48
N73G	6.55
N73L	3.47
D74A	11.53
D74C	19.11
G75A	3.47
G75C	4.7
G75F	11.23
G75R	9.68
G75W	3.24
L76I	7.06
R77A	5.59
R77C	24.14
R77D	17.87
R77F	19.44
R77G	6.42
R77H	18.69
R77K	4.45
R77L	3.18
R77N	27.44
R77Q	5.4
R77S	26.28
R77W	14.62
G78D	30.26

FIGURA 46D

G78E	7.28
F79K	3.58
Q80G	5.77
T84H	4.38
T84N	4.63
T84Q	3.61
T87A	4.56
T87F	10.68
T87H	3.02
T87W	4.76
L88A	3.11
L88C	5.35
L88H	5.98
Q90N	3.66
Q90W	10.88
I91G	40.44
I91L	7.89
I91M	8.25
I91S	50.1
L92G	48.24
L92N	58.72
L92Q	34.3
L92S	6.32
L92T	14.59
L92Y	35.1
Q93P	15.14
D94P	6.43
V95F	3.15
V95N	5.79
V95Q	9.2
K96P	7.91
A97C	3.52
A97P	11.7
A98P	5.42
A98V	5.62
A100D	12.11
A100E	8.23
A100Q	9.29
A100Y	3.33
P102L	5.39
P102Q	4.73

FIGURA 46E

P102R	9.77
L103E	6.37
L103K	4.03
L104A	34.92
L104Q	14.84
L104W	14.88
L104Y	3.25
M105C	4.72
M105E	4.3
M105F	4.17
M105L	4.82
Q106D	4.12
Q106G	7.15
Q106L	4.33
Q106V	3.38
Q106W	3.87
Q106Y	6.66
I107A	38.63
I107C	19.37
I107E	7.18
I107G	11.8
I107K	29.78
I107L	38.5
I107Q	25.71
I107S	4.17
I107T	8.3
R108G	8.53
L109F	5.13
L109V	32.35
L109Y	13.22
P110A	20.08
P110E	3.92
P110F	4.31
P110G	4.8
P110H	22.31
P110N	24.19
P110S	3.14
P110V	11.63
A111Y	4.58
N112F	3.1
N112P	3.5

FIGURA 46F

Y113D	7.02
Y113E	3.14
Y113P	6.39
R115W	13.16
Y117A	4.83
Y117D	6.71
Y117E	4.27
Y117G	7.9
Y117P	8.97
Y117Q	4.65
N118F	6.41
E119P	5.92
A120P	7.4
F121C	7.33
F121L	2.95
F121M	4.56
F121N	5.99
F121Q	7.56
F121R	5.7
F121V	5.95
F121W	8.69
F121Y	5.61
S122D	4.01
S122F	3.37
S122L	5.09
S122P	5.48
S122W	5.64
S122Y	7.13
I124A	3.2
I124G	4.26
I124H	3.91
I124K	4.95
I124R	5.09
K127P	4.82
L128S	5.28
A129I	7.03
A129W	5.66
A129Y	4.68
K130P	5.67
L136A	5.53
L136D	6.18

FIGURA 46G

L136E	14.53
L136G	16.68
L136K	4.2
L136N	6.97
L136P	5.97
L136Q	3.19
L136S	3.2
L136T	9.17
L137A	13.72
L137C	4.56
L137H	17.74
L137K	4.68
L137Q	16.1
L137S	16.41
L137Y	4.51
P138F	8.47
F139L	4
F139M	9.77
F140C	8.5
F140I	5.75
F140L	7.6
F140M	11.44
F140V	5.4
M141T	3.63
E143P	8.01
V144H	3.57
Y145I	6.61
L146G	3
L146P	10.14
W150G	2.98
W150I	6.42
W150V	12.18
M151F	6.24
M151L	5.43
M151R	8.2
M151S	3.62
M151T	5.19
M151W	3.09
Q152N	4.22
Q152V	7.76
Q152Y	4.88

FIGURA 46H

D154C	12.35
D154E	5.76
G155I	4.41
I156C	5.24
I156K	7.75
I156T	6.83
I156V	4.43
P158G	3.01
P158T	7.31
A162T	8.21
Q163A	5.37
Q163C	5.25
Q163E	5.17
Q163I	4.83
Q163S	5.27
Q163T	3.47
Q163V	3.25
I166C	3.39
A167E	8.68
A167F	8.37
A167L	5.18
A167N	6.56
A167R	4.61
A167V	3.39
A167Y	7.5
W169K	5.3
M170N	3.97
M170S	4.35
Q173D	3.48
L174A	7.12
L174T	11.05
L174W	3.59

FIGURA 47A

Mutação	% de cadeia curta Z-Score
A13V	7.09
R16A	11.68
M17T	7.96
A25S	3.27
D29M	3.68
W31L	3.55
T35Y	4.06
S36W	3.53
V38S	3.40
P55A	3.39
P55G	4.06
L57I	4.09
L58M	3.45
L58V	4.08
K59E	3.50
H61W	3.16
Q62M	3.02
P63V	3.29
R64M	3.08
W65L	3.30
V66C	5.80
L67C	5.55
L67M	3.18
G78F	3.39
G78M	3.80
G78R	3.31
G78T	6.98
G78V	4.03
F79K	5.25
F79Y	3.92
Q82A	3.27
Q82M	3.26
Q82R	3.05
Q83G	3.70
Q83K	4.81
T84M	3.89
T84V	3.61
E85A	3.07

FIGURA 47B

E85C	4.50
E85G	4.06
E85Q	4.15
E85S	3.63
E85T	3.30
E85V	3.44
E85W	3.96
E85Y	3.69
Q86H	3.43
Q86Y	3.32
T87R	3.52
R89V	3.51
Q90L	3.16
Q93M	3.31
Q93N	3.61
Q93V	3.18
D94C	3.53
D94L	3.52
V95G	3.30
K96C	3.24
A97N	4.73
A97V	4.59
A98G	3.67
A98Y	4.87
M105I	3.47
Q106K	3.18
Q106R	4.48
R108W	3.83
A111E	4.12
A111N	5.07
A111S	4.21
A111W	6.93
A111Y	4.86
Y113A	3.19
Y113S	3.04
Y113V	4.98
G114K	3.54
G114Y	3.66
Y117R	5.13
E119M	4.08
E119Q	3.49

FIGURA 47C

E119R	3.28
S122F	3.57
S122I	5.40
S122M	6.27
S122R	5.14
P126K	3.97
F132C	4.67
F132D	4.72
F132K	3.54
F132L	4.13
F132N	4.95
F132V	4.28
P135A	3.60
P135E	4.28
P135K	3.75
P135Q	3.37
L136H	4.45
F139L	3.92
E142W	3.17
V144Y	3.35
Y145A	6.56
Y145C	8.23
Y145D	4.08
Y145E	7.49
Y145G	4.43
Y145I	5.79
Y145L	9.47
Y145M	4.49
Y145N	4.71
Y145R	7.80
Y145S	6.13
Y145T	5.12
D153K	3.32
D153Q	3.10
D161K	3.21
A162I	3.34
F165K	3.34
D168W	3.59
Q173I	4.32
Q175M	3.35
P176Q	4.15

FIGURA 47D

P176R	4.03
P176V	31.09
V178F	6.09
V178G	4.08
V178L	4.38
V178R	6.56
V178S	4.09
V178T	7.82
N179H	3.08
H180E	3.85
H180P	3.13
H180R	4.08
H180S	4.02
H180V	3.27
H180W	3.32
D181R	3.24
D181T	3.06
S182C	3.07
S182D	5.28
S182G	3.84
S182P	5.05
S182R	3.11

FIGURA 48A

Mutação	% de cadeia curta Z-Score
A1C	-63.21
A1F	-9.02
A1L	-44.70
A1Y	-8.32
D2L	-5.90
D2M	-4.92
D2P	-19.11
D2W	-20.50
T3R	-26.69
L4A	-6.44
L4M	-4.38
L4N	-42.37
L4S	-40.54
L4V	-5.67
L4Y	-5.91
L5E	-35.71
L5F	-4.80
L5G	-7.53
L5K	-30.43
L5N	-42.32
L5S	-4.31
L5W	-31.99
I6T	-14.34
L7A	-3.04
L7E	-42.41
L7K	-37.04
L7M	-21.53
L7W	-57.14
G8K	-214.60
D9N	-14.32
D9T	-120.67
L11A	-16.08
L11C	-107.22
L11I	-7.83
L11M	-101.21
L11Q	-91.91
L11V	-116.56
S12I	-93.25
S12L	-12.25

FIGURA 48B

S12M	-4.54
S12N	-18.74
S12T	-3.35
S12V	-78.58
S12Y	-12.22
A13C	-3.99
G14C	-39.75
G14E	-100.31
G14I	-102.00
G14M	-111.79
G14N	-35.52
G14P	-60.98
G14S	-5.26
G14T	-21.65
G14V	-9.41
Y15C	-18.57
Y15E	-80.36
Y15G	-77.73
Y15I	-62.75
Y15N	-102.87
Y15V	-25.60
R16T	-7.14
M17D	-11.63
M17E	-27.51
M17G	-4.41
M17L	-7.33
M17N	-8.89
M17P	-3.70
M17R	-46.44
M17S	-16.39
M17V	-22.23
S18M	-5.57
S18N	-35.29
S18T	-7.42
A19E	-4.77
A19L	-22.51
A19V	-25.84
A21P	-3.45
A22D	-3.98
A22E	-12.41
A22F	-23.02

FIGURA 48C

A22H	-15.49
A22I	-12.96
A22K	-18.01
A22L	-24.96
A22P	-11.17
A22R	-19.43
A22S	-4.85
A22T	-4.65
A22Y	+10.55
W23A	-24.50
W23H	-87.01
W23N	-13.53
W23P	-19.15
P24A	-5.88
P24C	-8.82
P24D	-16.32
P24E	-17.09
P24F	-26.45
P24G	-17.75
P24I	-4.37
P24M	-22.41
P24N	-13.92
P24S	-12.83
P24T	-9.58
P24V	-4.54
P24W	-30.72
L26P	-21.59
L27A	+19.17
L27C	-8.14
L27F	-4.31
L27H	-61.92
L27R	-58.76
L27S	+62.16
L27T	-45.28
L27W	-8.60
L27Y	-17.79
K30P	-4.76
W31D	-4.32
W31P	-4.55
W31R	-3.68
S36F	-4.42

FIGURA 48D

S36L	-4.11
V37G	-11.20
V37H	-10.89
V37N	-33.74
V37Q	-10.69
V37W	-30.09
V37Y	-12.66
V38P	-3.60
N39E	-6.92
N39G	-3.17
N39K	-48.33
N39M	-39.26
N39P	-4.38
N39Q	-3.40
N39Y	-7.53
I42D	-12.43
I42G	-3.39
I42P	-18.84
G44A	-12.40
G44E	-16.26
G44K	-7.30
G44M	-11.89
G44N	-13.25
G44R	-3.19
G44S	-18.29
G44W	-15.05
G44Y	-10.81
D45G	-5.89
D45M	-4.57
T46D	-7.57
S47E	-3.25
S47P	-21.28
S47Q	-5.63
S47R	-6.47
S47Y	-8.31
Q48Y	-3.34
G50C	-8.06
G50E	-31.84
G50F	-19.16
G50I	-19.41
G50K	-16.73

FIGURA 48E

G50L	-19.75
G50M	-14.11
G50N	-20.46
G50P	-53.52
G50Q	-16.90
G50R	-45.44
G50S	-17.05
G50T	-36.12
G50W	-26.95
G50Y	-28.67
L51D	-10.49
L51P	-44.08
L51T	-4.49
A52P	-40.24
R53A	-6.83
R53C	-48.10
R53D	-16.24
R53E	-15.22
R53F	-60.20
R53G	-6.40
R53I	-15.55
R53K	-3.63
R53L	-14.72
R53N	-4.40
R53S	-6.28
R53T	-38.15
R53V	-13.28
R53W	-15.21
R53Y	-16.67
L54C	-5.06
L54E	-5.47
L54G	-3.80
L54N	-5.95
L54Y	-17.42
P55Y	-3.37
L57P	-3.06
H61A	-7.21
H61D	-5.86
H61E	-9.15
P63D	-98.14
P63E	-42.96

FIGURA 48F

P63G	-28.12
P63K	-70.32
P63M	-5.00
P63N	-19.05
P63Q	-34.79
P63R	-64.59
R64L	-4.58
W65G	-12.80
W65P	-8.14
W65R	-3.23
V66N	-5.41
V66Q	-6.18
V66S	-6.63
V66W	-3.70
V66Y	-6.28
L67E	-8.21
L67G	-6.01
L67Q	-60.05
L67R	-12.02
L67S	-6.98
L67W	-4.14
V68E	-11.51
V68G	-60.22
V68N	-4.74
V68P	-3.83
V68Q	-5.85
E69A	-28.03
E69C	-27.17
E69D	-61.95
E69F	-24.68
E69G	-28.66
E69H	-28.86
E69K	-32.28
E69L	-25.27
E69M	-27.85
E69N	-27.47
E69P	-25.46
E69Q	-35.73
E69S	-49.76
E69V	-18.30
E69W	-66.11

FIGURA 48G

E69Y	-37.18
L70A	-42.86
L70C	-3.55
L70E	-42.71
L70F	-19.50
L70G	-94.13
L70H	-25.17
L70K	-29.95
L70Q	-20.11
L70S	-7.68
L70T	-14.42
L70W	-57.74
G71C	-32.31
G71S	-56.24
G72A	-26.23
G72M	-33.06
G72P	-47.28
N73A	-4.63
N73G	-13.51
N73H	-10.61
N73I	-8.43
N73L	-7.30
N73P	-9.25
N73R	-6.25
N73S	-8.04
N73T	-28.23
N73W	-7.23
D74A	-45.23
D74C	-31.24
D74F	-28.47
D74G	-60.70
D74Q	-24.51
D74S	-38.03
D74W	-49.27
D74Y	-99.77
G75A	-20.56
G75C	-48.09
G75D	-81.21
G75E	-42.01
G75F	-48.35
G75I	-32.43

FIGURA 48H

G75K	-26.46
G75L	-32.30
G75M	-24.38
G75N	-52.61
G75P	-62.43
G75R	-31.94
G75T	-53.18
G75V	-57.06
G75W	-56.35
G75Y	-57.62
L76A	-22.79
L76C	-7.92
L76D	-12.58
L76E	-30.25
L76F	-19.25
L76G	-26.23
L76I	-6.81
L76K	-4.47
L76M	-4.68
L76N	-31.55
L76P	-8.17
L76Q	-9.92
L76R	-6.71
L76T	-25.68
L76V	-6.91
L76W	-5.04
R77A	-26.49
R77C	-9.00
R77D	-30.03
R77E	-20.54
R77F	-24.10
R77G	-9.49
R77H	-24.48
R77N	-8.48
R77S	-10.71
R77V	-22.45
R77W	-28.93
G78A	-6.52
G78C	-8.34
G78D	-9.99
G78E	-3.95

FIGURA 48I

G78N	-8.13
G78P	-10.38
G78Q	-18.48
G78Y	-21.82
F79P	-28.78
F79Q	-6.47
F79S	-4.11
F79V	-3.46
P81E	-3.29
P81W	-3.14
T84D	-88.05
T84E	-41.00
T84G	-26.25
T84H	-10.81
T84K	-63.88
T84L	-23.82
T84N	-7.78
T84Q	-3.62
T84R	-46.36
T84W	-36.11
T84Y	-24.81
E85F	-13.79
E85P	-53.55
Q86A	-5.22
T87F	-4.59
L88A	-25.28
L88E	-37.11
L88G	-32.24
L88H	-20.68
L88Q	-42.32
L88S	-46.95
L88W	-30.65
L88Y	-29.41
R89P	-24.05
Q90P	-31.92
Q90W	-3.38
I91E	-79.82
I91L	-5.73
I91M	-30.56
I91N	-42.09
I91Q	-38.31

FIGURA 48J

I91S	-4.95
I91Y	-43.76
L92C	-4.99
L92E	-73.12
L92G	-5.00
L92H	-9.88
L92N	-7.93
L92Q	-19.11
L92R	-84.60
L92S	-8.48
L92Y	-13.84
Q93P	-32.68
D94P	-7.30
D94V	-3.57
V95A	-3.75
V95C	-5.62
V95D	-29.29
V95E	-30.46
V95F	-20.99
V95I	-8.56
V95P	-59.35
V95Q	-22.52
V95W	-24.15
V95Y	-33.39
K96P	-8.92
A97C	-7.38
A97P	-15.17
N99D	-33.21
A100Q	-5.06
A100Y	-4.26
P102E	-46.58
P102G	-3.79
P102H	-45.32
P102L	-3.44
P102R	-10.05
P102V	-8.26
P102W	-22.77
L103C	-3.18
L103E	-24.55
L103I	-3.75
L103K	-5.44

FIGURA 48L

L103N	-11.31
L103R	-4.04
L103S	-4.81
L103T	-11.37
L103V	-6.38
L104A	-11.07
L104C	-3.49
L104E	-28.11
L104G	-31.37
L104I	-7.05
L104N	-32.01
L104P	-3.12
L104Q	-22.01
L104S	-61.20
L104W	-18.48
L104Y	-23.89
M105A	-28.83
M105C	-10.71
M105E	-6.53
M105F	-3.85
M105G	-18.71
M105K	-34.14
M105L	-5.29
M105P	-102.51
M105T	-11.34
M105W	-50.61
Q106D	-10.02
Q106G	-9.34
Q106H	-14.02
Q106L	-20.17
Q106W	-11.32
I107A	-17.31
I107E	-32.09
I107F	-20.95
I107G	-28.47
I107K	-22.87
I107L	-3.00
I107Q	-18.95
I107S	-23.44
I107T	-7.98
I107Y	-22.72

FIGURA 48M

R108A	-10.47
R108C	-9.20
R108D	-13.69
R108E	-9.20
R108F	-5.75
R108G	-10.70
R108H	-9.69
R108I	-5.35
R108L	-9.87
R108M	-5.49
R108S	-11.02
R108V	-9.68
R108Y	-9.49
L109C	-41.59
L109F	-28.41
L109G	-42.09
L109K	-69.64
L109Q	-50.80
L109R	-29.08
L109T	-41.67
L109V	-23.71
L109Y	-43.56
P110A	-33.63
P110C	-25.47
P110D	-24.31
P110E	-17.72
P110F	-43.41
P110G	-23.80
P110H	-34.80
P110K	-30.19
P110L	-23.19
P110M	-23.20
P110N	-33.38
P110R	-51.79
P110S	-22.47
P110V	-33.71
P110W	-39.36
A111C	-9.89
A111L	-3.57
A111P	-4.23
A111Q	-5.35

FIGURA 48N

A111R	-6.12
A111V	-4.23
N112I	-10.62
N112L	-4.98
N112P	-11.54
N112Y	-5.03
Y113D	-11.51
Y113E	-3.61
Y113Q	-3.02
G114A	-9.61
R115W	-10.95
Y117D	-6.37
Y117G	-4.14
Y117P	-4.06
N118F	-3.92
E119C	-3.87
E119L	-7.23
A120P	-6.88
F121A	-28.88
F121C	-5.63
F121D	-42.24
F121E	-39.48
F121G	-15.38
F121K	-42.52
F121L	-19.00
F121N	-18.73
F121P	-41.32
F121Q	-11.85
F121R	-13.32
F121S	-29.43
F121V	-9.75
F121W	-3.56
F121Y	-13.42
S122D	-9.90
S122E	-7.17
S122L	-5.66
S122P	-10.63
I124D	-37.98
I124E	-27.01
I124G	-8.97
I124H	-10.69

FIGURA 48O

I124K	-4.59
I124R	-4.97
I124W	-15.37
I124Y	-23.96
Y125C	-19.68
Y125G	-21.01
Y125H	-30.52
Y125I	-17.04
Y125L	-24.91
Y125P	-21.87
Y125Q	-23.99
Y125R	-20.53
Y125S	-21.85
Y125T	-21.27
Y125V	-21.89
K127A	-6.42
L128E	-27.59
L128F	-22.69
L128G	-29.74
L128K	-21.82
L128Q	-18.58
L128R	-41.57
L128S	-6.88
L128W	-40.49
A129D	-32.30
A129F	-17.62
A129L	-20.77
A129W	-8.30
A129Y	-11.75
K130P	-8.51
K130V	-4.75
E131A	-12.26
E131C	-7.90
E131D	-3.75
E131P	-60.42
E131V	-3.20
F132P	-67.58
D133C	-5.33
V134C	-3.68
V134D	-5.51
V134N	-14.94

FIGURA 48P

V134P	-64.09
V134W	-9.68
L136A	-4.43
L136D	-25.03
L136E	-9.24
L136G	-11.96
L136N	-12.24
L136P	-12.86
L136T	-5.66
L137D	-77.81
L137E	-44.88
L137G	-64.00
L137H	-9.52
L137K	-21.51
L137P	-59.72
L137Q	-3.55
L137R	-45.70
L137S	-12.66
P138G	-7.85
P138N	-66.99
P138V	-7.12
F139A	-38.52
F139C	-19.20
F139D	-51.25
F139E	-54.34
F139G	-23.27
F139H	-47.30
F139M	-14.75
F139N	-20.27
F139S	-28.56
F139T	-25.28
F139V	-51.37
F139W	-28.49
F140A	-23.45
F140C	-17.35
F140G	-59.93
F140I	-9.48
F140L	-11.28
F140M	-8.79
F140N	-34.77
F140P	-35.35

FIGURA 48Q

F140S	-46.16
F140T	-47.57
F140V	-11.26
F140W	-20.83
M141C	-5.00
M141D	-22.31
M141E	-28.46
M141F	-26.20
M141G	-16.10
M141K	-32.04
M141L	-6.54
M141P	-5.70
M141Q	-22.98
M141R	-33.51
M141T	-10.69
M141W	-48.57
M141Y	-29.44
E142A	-5.76
E142C	-23.94
E142G	-4.51
E142I	-3.28
E142L	-13.49
E142M	-3.24
E142P	-5.72
E142Q	-6.34
E142R	-6.85
E142T	-4.28
E142V	-4.47
E143A	-7.08
E143D	-5.09
E143F	-5.68
E143G	-3.69
E143I	-4.21
E143M	-8.02
E143P	-8.28
E143W	-4.76
V144A	-3.67
V144D	-17.15
V144E	-13.28
V144G	-18.12
V144H	-15.74

FIGURA 48R

V144N	-19.72
V144P	-9.89
V144Q	-11.28
V144R	-14.09
V144S	-16.74
Y145Q	-16.20
Y145W	-24.17
L146C	-5.36
L146P	-7.13
W150P	-8.88
W150R	-3.07
M151A	-22.29
M151C	-13.48
M151D	-53.94
M151E	-36.34
M151F	-6.85
M151G	-28.78
M151I	-12.66
M151L	-7.98
M151Q	-14.75
M151R	-6.83
M151S	-18.89
M151T	-5.52
M151V	-12.16
M151W	-18.58
Q152P	-4.80
D153A	-7.19
D153E	-3.25
D153F	-4.87
D154A	-23.82
D154C	-3.67
D154E	-22.22
D154F	-58.92
D154G	-25.00
D154H	-31.59
D154I	-64.36
D154K	-29.79
D154L	-60.21
D154M	-25.21
D154N	-28.72
D154P	-58.38

FIGURA 48S

D154R	-28.30
D154S	-39.88
D154T	-59.86
D154V	-59.21
D154W	-60.95
G155A	-3.44
G155P	-27.12
G155V	-5.61
I156A	-11.30
I156C	-7.69
I156E	-30.46
I156F	-12.66
I156G	-54.46
I156K	-19.45
I156M	-11.92
I156Q	-12.81
I156R	-12.93
I156S	-15.73
I156T	-19.26
I156Y	-20.27
H157C	-5.78
H157E	-22.88
P158F	-13.72
P158H	-12.61
P158I	-21.00
P158L	-11.13
P158Q	-11.63
P158V	-10.02
P158W	-30.29
N159P	-31.69
N159W	-15.96
A162K	-21.65
A162L	-20.87
A162N	-24.35
A162R	-17.88
A162Y	-21.36
Q163A	-7.69
Q163D	-52.48
Q163E	-5.19
Q163F	-30.51
Q163I	-4.62

FIGURA 48T

Q163V	-10.61
Q163W	-18.60
Q163Y	-24.52
F165L	-16.68
I166A	-12.07
I166F	-18.25
I166M	-7.12
I166S	-55.69
I166Y	-14.41
A167C	-4.32
A167D	-22.48
A167E	-3.95
A167F	-13.29
A167L	-6.74
A167N	-10.52
A167R	-8.46
A167V	-5.29
A167W	-81.07
A167Y	-7.34
D168M	-3.18
D168R	-3.50
M170E	-5.17
M170F	-4.50
M170G	-34.58
M170N	-11.65
M170S	-11.08
M170T	-9.46
A171S	-26.54
Q173D	-10.77
Q173P	-44.61
L174A	-12.29
L174G	-29.08
L174S	-44.11
L174T	-4.63
L174W	-7.19
L174Y	-47.03
Q175F	-38.91
P176L	-8.35
P176Y	-4.38
L177F	-4.83
L177M	-4.34
L177S	-3.75
D181C	-8.46
D181E	-5.68
D181G	-3.39

FIGURA 49A

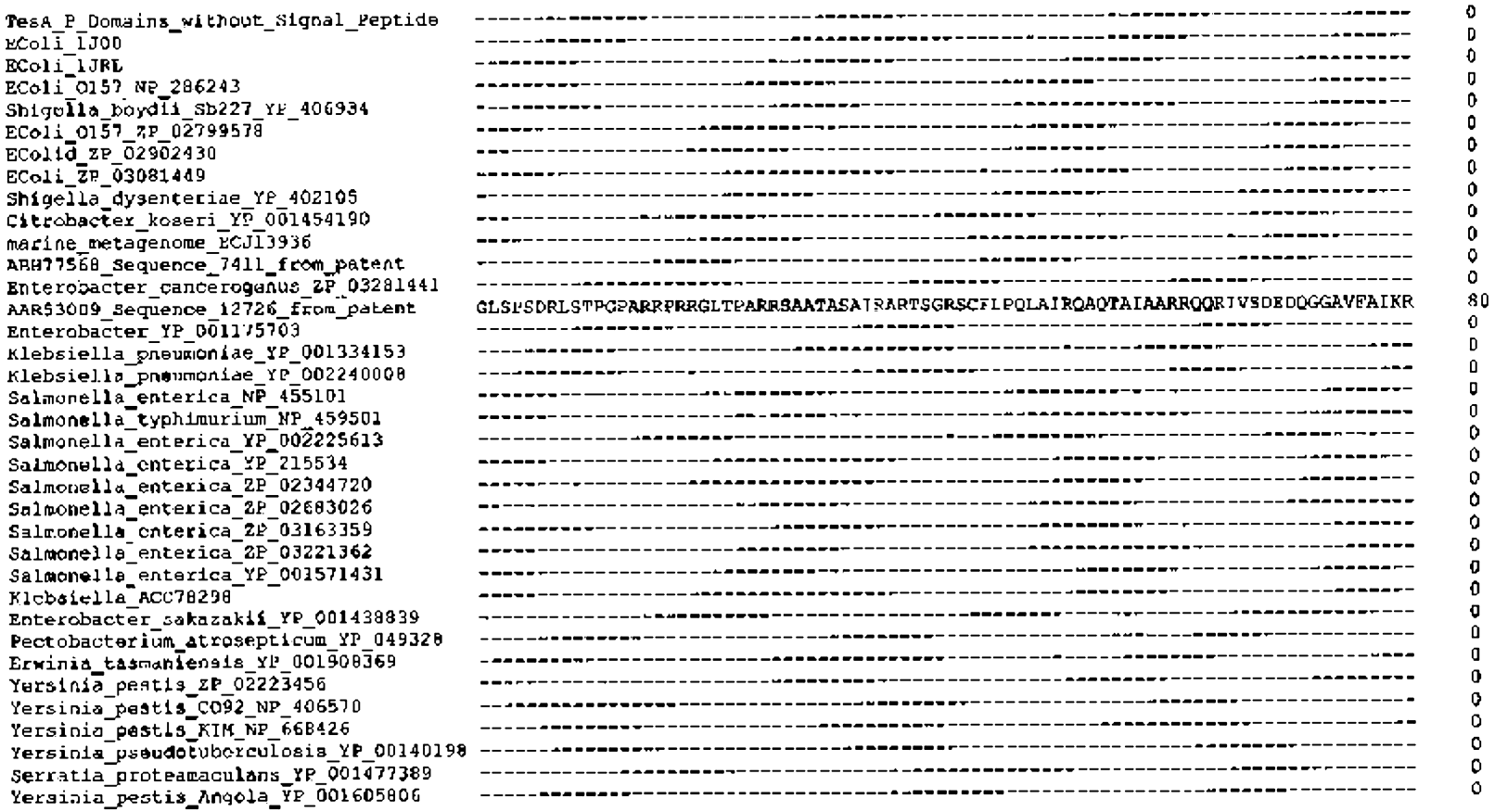

TesA_P_Domains_without_Signal_Peptide
EColi_1J00
EColi_1JRL
EColi_O157_NP_286243
Shigella_boydii_Sb227_YP_406934
EColi_O157_ZP_02799578
EColi_ZP_02902430
EColi_ZP_03081449
Shigella_dysenteriae_YP_402105
Citrobacter_koseri_YP_001454190
marine_metagenome_EGJ13936
ABH77568_Sequence_7411_from_patent
Enterobacter_cancerogenus_ZP_03281441
AAR53009_Sequence_12726_from_patent
Enterobacter_YP_001175703
Klebsiella_pneumoniae_YP_001334153
Klebsiella_pneumoniae_YP_002240008
Salmonella_enterica_NP_455101
Salmonella_typhimurium_NP_459501
Salmonella_enterica_YP_002225613
Salmonella_enterica_YP_215534
Salmonella_enterica_ZP_02344720
Salmonella_enterica_ZP_02683026
Salmonella_enterica_ZP_03163359
Salmonella_enterica_ZP_03221362
Salmonella_enterica_YP_001571431
Klebsiella_ACC78298
Enterobacter_sakazakii_YP_001438839
Pectobacterium_atrosepticum_YP_049328
Erwinia_tasmaniensis_YP_001908369
Yersinia_pestis_ZP_02223456
Yersinia_pestis_CO92_NP_406570
Yersinia_pestis_KIM_NP_668426
Yersinia_pseudotuberculosis_YP_00140198
Serratia_proteamaculans_YP_001477389
Yersinia_pestis_Angola_YP_001605806
GLSPSDRLSTPGPARRPRRGLTPARRSAATASATRARTSGRSCFLPQLAIRQAQTAIAARRQQRIVSDEDQGGAVFAIKR
80

FIGURA 49B

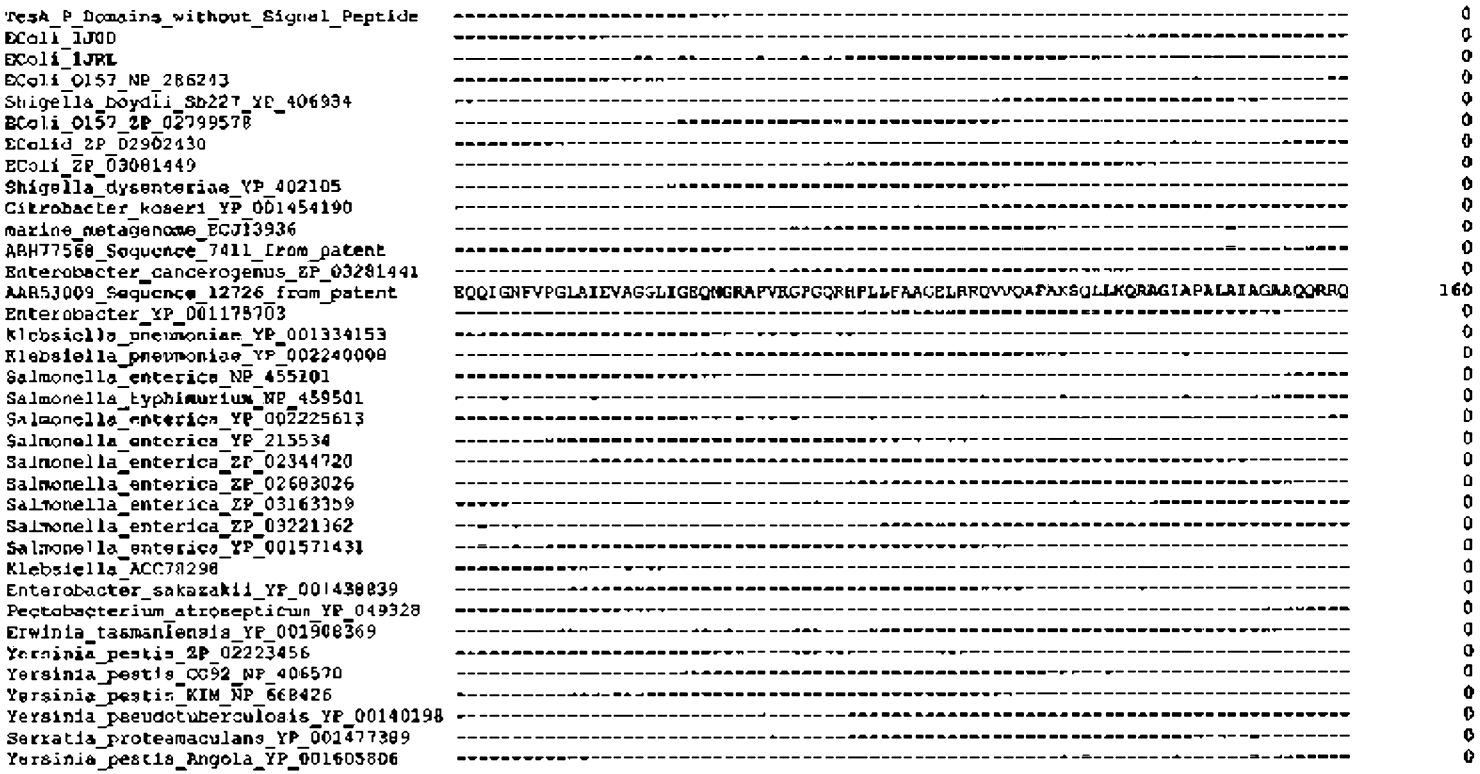

TesA_P_Domains_without_Signal_Peptide
EColi_1JJD
EColi_1JRL
EColi_O157_NP_286243
Shigella_boydii_Sb227_YP_406934
EColi_O157_ZP_02799578
EColid_ZP_02902430
EColi_ZP_03081449
Shigella_dysenteriae_YP_402105
Citrobacter_koseri_YP_001454190
marine_metagenome_EGJ13936
ABH77588_Sequence_7411_from_patent
Enterobacter_cancerogenus_ZP_03281441
AAR53009_Sequence_12726_from_patent
EQQIGNFVPGLAIEVAGGLIGEQNGRAFVEGPGQRHPLLFAAGELRRQVVQAFAKSQLLKQRAGIAPALAIAGAAQQRRQ
160
Enterobacter_YP_001175703
Klebsiella_pneumoniae_YP_001334153
Klebsiella_pneumoniae_YP_002240008
Salmonella_enterica_NP_455201
Salmonella_typhimurium_NP_459501
Salmonella_enterica_YP_002225613
Salmonella_enterica_YP_215534
Salmonella_enterica_ZP_02344720
Salmonella_enterica_ZP_02603026
Salmonella_enterica_ZP_03163359
Salmonella_enterica_ZP_03221362
Salmonella_enterica_YP_001571431
Klebsiella_ACC78298
Enterobacter_sakazakii_YP_001438839
Pectobacterium_atrosepticum_YP_049328
Erwinia_tasmaniensis_YP_001908369
Yersinia_pestis_ZP_02223456
Yersinia_pestis_CO92_NP_406570
Yersinia_pestis_KIM_NP_668426
Yersinia_pseudotuberculosis_YP_00140198
Serratia_proteamaculans_YP_001477389
Yersinia_pestis_Angola_YP_001605806

FIGURA 49C

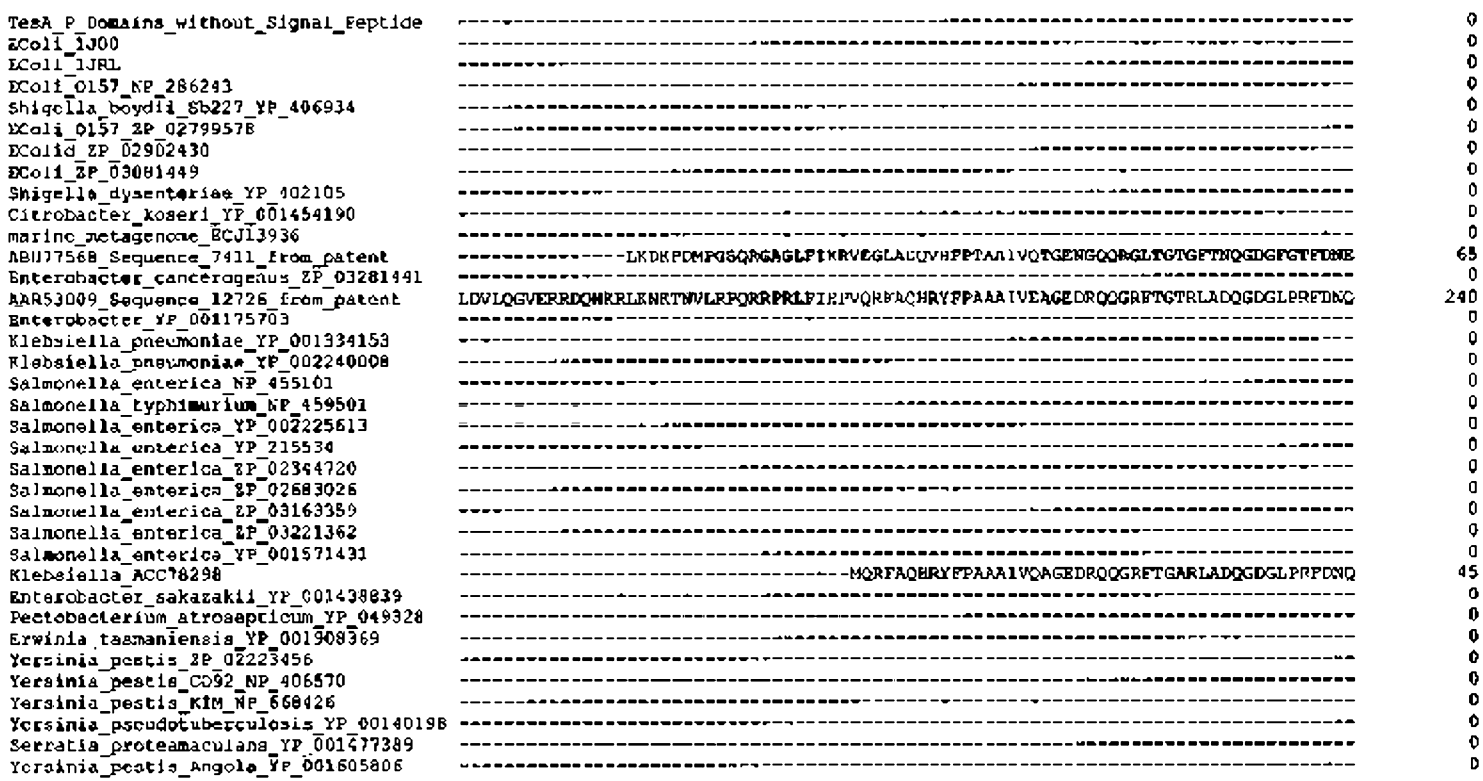

TesA_P_Domains_without_Signal_Peptide
EColi_1J00
EColi_1JRL
EColi_O157_NP_286243
Shigella_boydii_Sb227_YP_406934
EColi_O157_ZP_02799578
EColiD_ZP_02902430
EColi_ZP_03081449
Shigella_dysenteriae_YP_402105
Citrobacter_koseri_YP_001454190
marine_metagenome_ECJ13936
ABU77568_Sequence_7411_from_patent
Enterobacter_cancerogenus_ZP_03281441
AAR53009_Sequence_12726_from_patent
Enterobacter_YP_001175703
Klebsiella_pneumoniae_YP_001334153
Klebsiella_pneumoniae_YP_002240008
Salmonella_enterica_NP_455101
Salmonella_typhimurium_NP_459501
Salmonella_enterica_YP_002225613
Salmonella_enterica_YP_215534
Salmonella_enterica_ZP_02364720
Salmonella_enterica_ZP_02683026
Salmonella_enterica_ZP_03163359
Salmonella_enterica_ZP_03221362
Salmonella_enterica_YP_001571431
Klebsiella_ACC78298
Enterobacter_sakazakii_YP_001438839
Pectobacterium_atrosepticum_YP_049328
Erwinia_tasmaniensis_YP_001908369
Yersinia_pestis_ZP_02223456
Yersinia_pestis_CO92_NP_406570
Yersinia_pestis_KIM_NP_668426
Yersinia_pseudotuberculosis_YP_00140198
Serratia_proteamaculans_YP_001477389
Yersinia_pestis_Angola_YP_001605806

FIGURA 49D

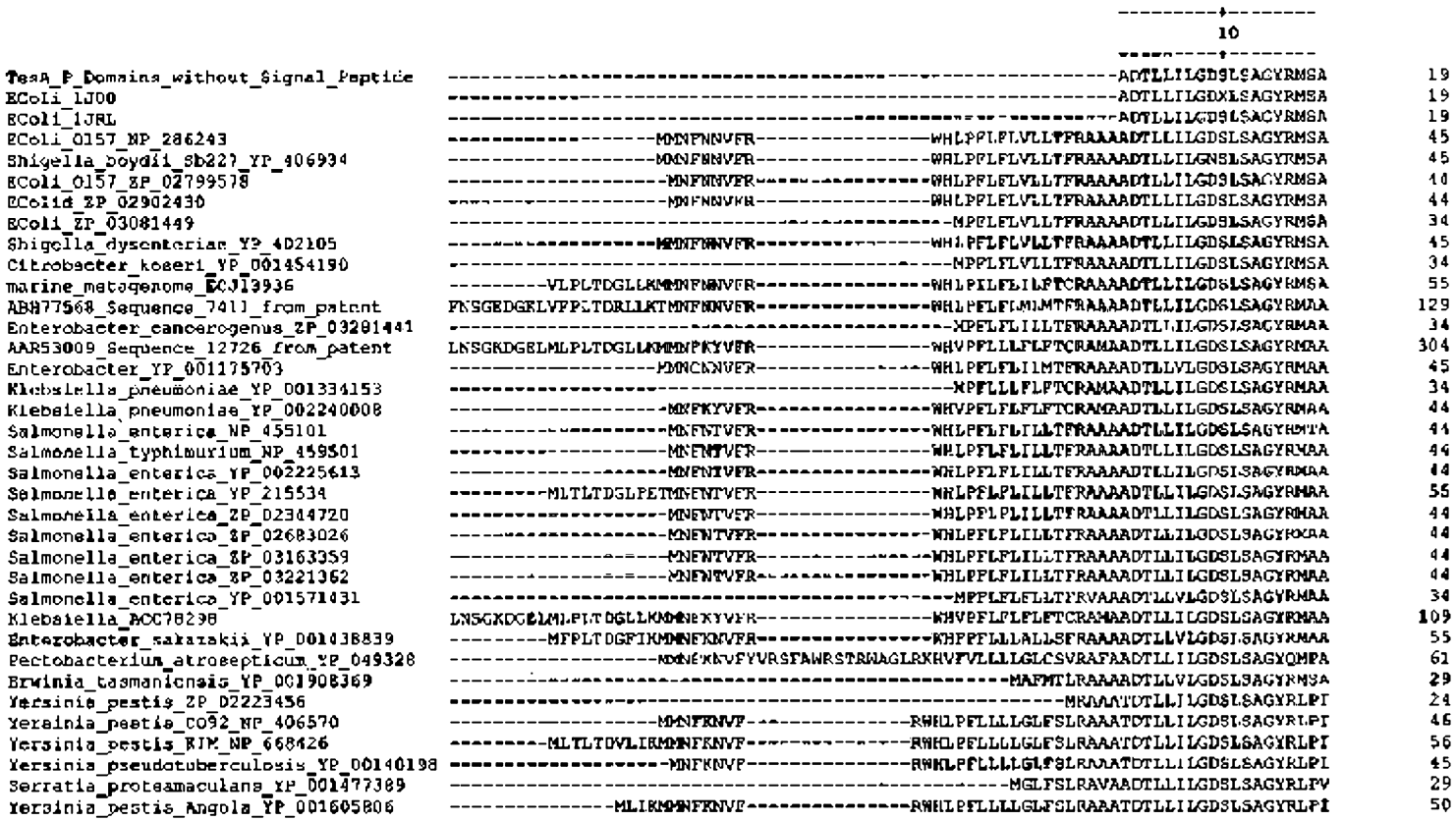

10
TesA_P_Domains_without_Signal_Peptide
EColi_1J00
EColi_1JRL
EColi_0157_NP_286243
Shigella_boydii_Sb227_YP_406934
EColi_0157_ZP_02799578
EColi_ZP_02902430
EColi_ZP_03081449
Shigella_dysenteriae_YP_402105
Citrobacter_koseri_YP_001454190
marine_metagenome_EC013936
ABH77568_Sequence_7411_from_patent
Enterobacter_cancerogenus_ZP_03201441
AAR53009_Sequence_12726_from_patent
Enterobacter_YP_001175703
Klebsiella_pneumoniae_YP_001334153
Klebsiella_pneumoniae_YP_002240008
Salmonella_enterica_NP_455101
Salmonella_typhimurium_NP_459501
Salmonella_enterica_YP_002225613
Salmonella_enterica_YP_215534
Salmonella_enterica_ZP_02384720
Salmonella_enterica_ZP_02683026
Salmonella_enterica_ZP_03163359
Salmonella_enterica_ZP_03221362
Salmonella_enterica_YP_001571431
Klebsiella_ACC78298
Enterobacter_sakazakii_YP_001438839
Pectobacterium_atrosepticum_YP_049328
Erwinia_tasmaniensis_YP_001908369
Yersinia_pestis_ZP_02223456
Yersinia_pestis_CO92_NP_406570
Yersinia_pestis_KIM_NP_668426
Yersinia_pseudotuberculosis_YP_00140198
Serratia_proteamaculans_YP_001477389
Yersinia_pestis_Angola_YP_001605806

FIGURA 49E

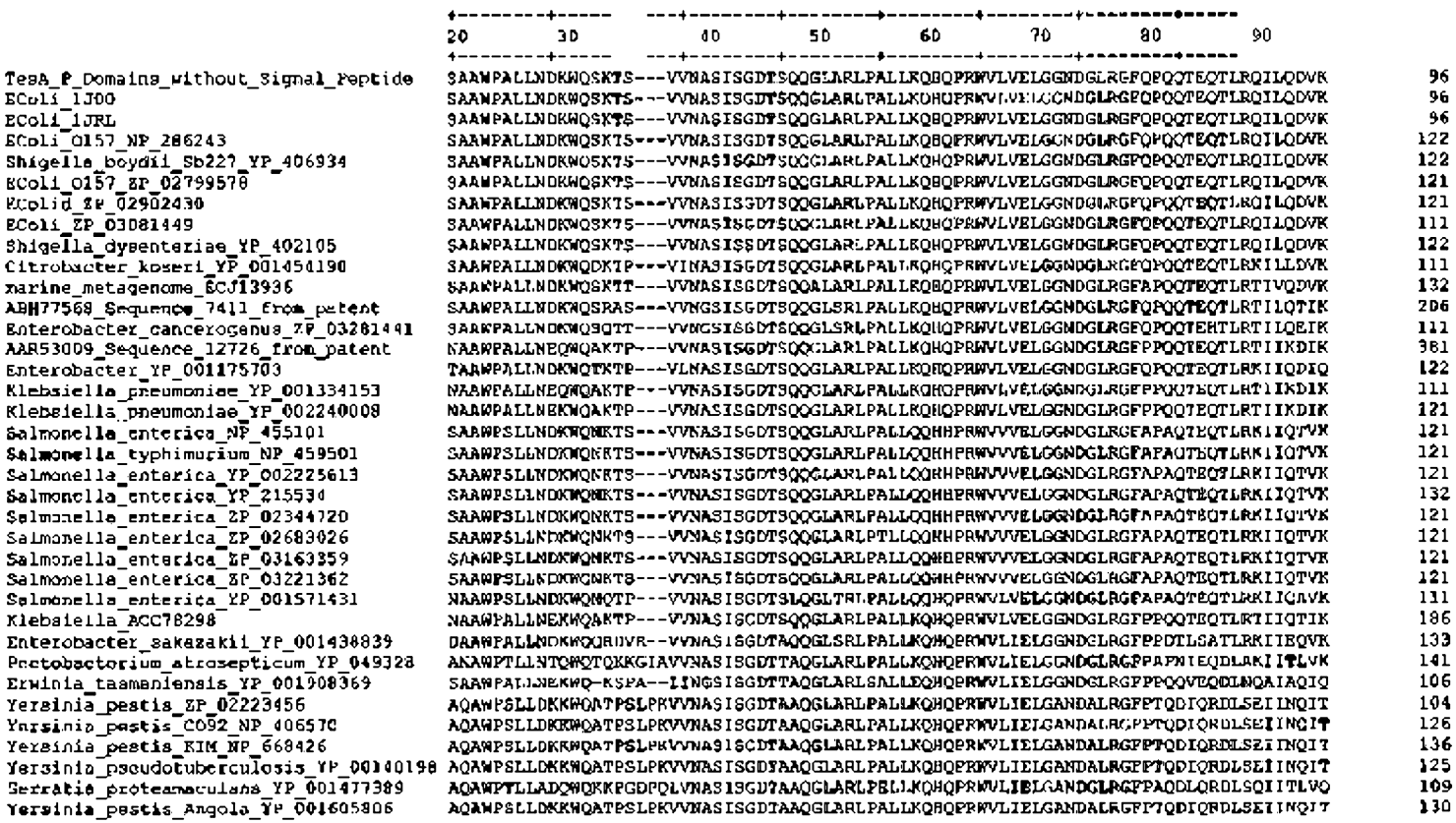

20
30
40
50
60
70
80
90
TesA_P_Domains_Without_Signal_Peptide
EColi_1J00
EColi_1JRL
EColi_O157_NP_286243
Shigella_boydii_Sb227_YP_406934
EColi_O157_ZP_02799578
EColid_ZP_02902430
EColi_ZP_03081449
Shigella_dysenteriae_YP_402105
Citrobacter_koseri_YP_001454190
marine_metagenome_ECJ13936
ABH77568_Sequence_7411_from_patent
Enterobacter_cancerogenus_ZP_03281441
AAR53009_Sequence_12726_from_patent
Enterobacter_YP_001175703
Klebsiella_pneumoniae_YP_001334153
Klebsiella_pneumoniae_YP_002240008
Salmonella_enterica_NP_455101
Salmonella_typhimurium_NP_459501
Salmonella_enterica_YP_002225613
Salmonella_enterica_YP_215530
Salmonella_enterica_ZP_02344720
Salmonella_enterica_ZP_02683026
Salmonella_enterica_ZP_03163359
Salmonella_enterica_ZP_03221362
Salmonella_enterica_YP_001571431
Klebsiella_ACC78298
Enterobacter_sakazakii_YP_001438839
Pectobacterium_atrosepticum_YP_049328
Erwinia_taamanlensis_YP_001908369
Yersinia_pestis_ZP_02223456
Yersinia_pestis_CO92_NP_406570
Yersinia_pestis_KIM_NP_668426
Yersinia_pseudotuberculosis_YP_001140198
Serratia_proteamaculans_YP_001477389
Yersinia_pestis_Angola_YP_001605806

FIGURA 49F

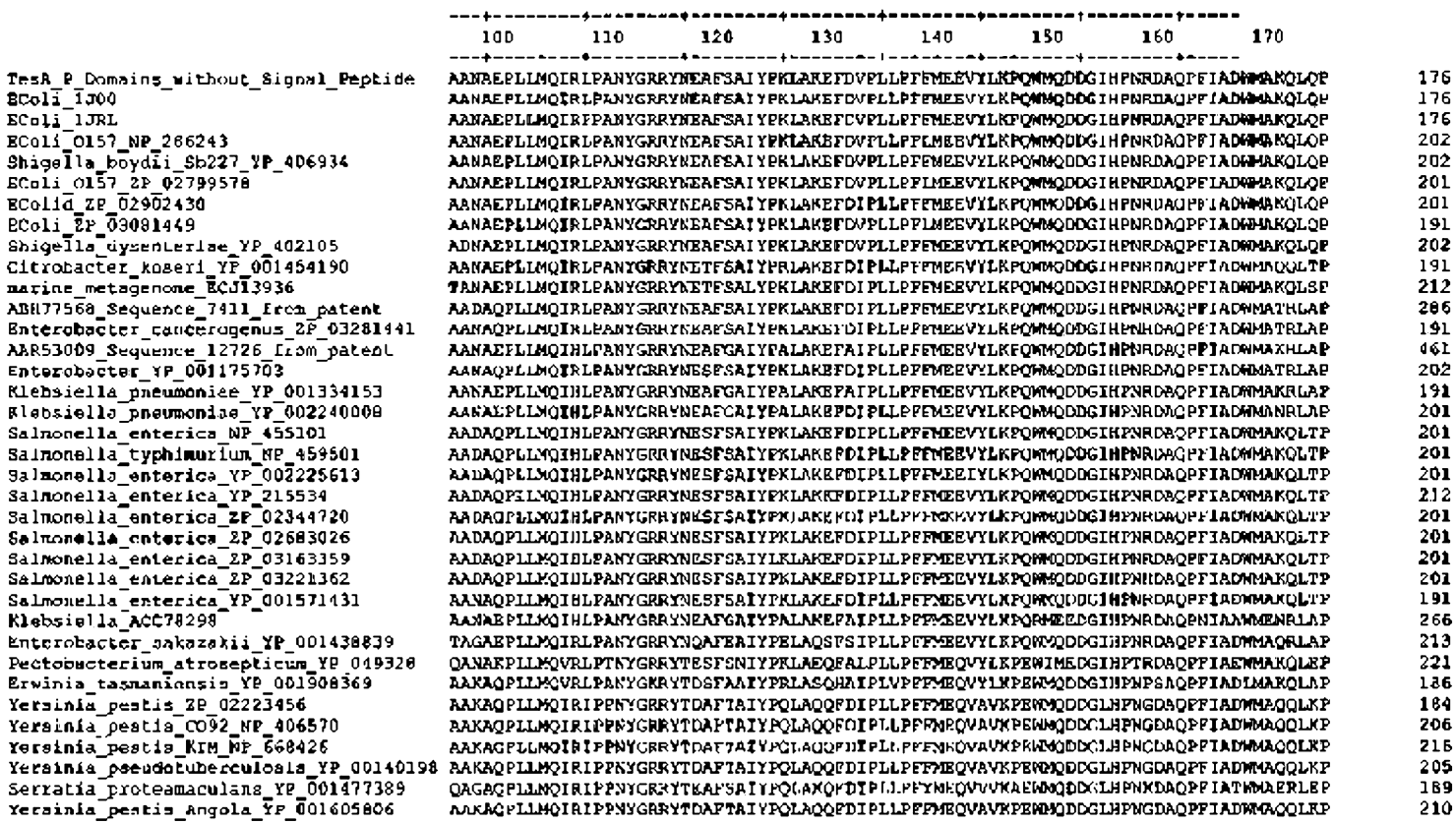

100
110
120
130
140
150
160
170
TesA_P_Domains_without_Signal_Peptide
EColi_1J00
EColi_1JRL
EColi_O157_NP_286243
Shigella_boydii_Sb227_YP_406934
EColi_O157_ZP_02799578
EColid_ZP_02902430
EColi_ZP_03081449
Shigella_dysenteriae_YP_402105
Citrobacter_koseri_YP_001454190
marine_metagenome_ECJ13936
ABH77568_Sequence_7411_from_patent
Enterobacter_cancerogenus_ZP_03281441
AAR53009_Sequence_12726_from_patent
Enterobacter_YP_001175703
Klebsiella_pneumoniae_YP_001334153
Klebsiella_pneumoniae_YP_002240008
Salmonella_enterica_NP_455101
Salmonella_typhimurium_NP_459501
Salmonella_enterica_YP_002225613
Salmonella_enterica_YP_215534
Salmonella_enterica_ZP_02344720
Salmonella_enterica_ZP_02683026
Salmonella_enterica_ZP_03163359
Salmonella_enterica_ZP_03221362
Salmonella_enterica_YP_001571431
Klebsiella_ACC78298
Enterobacter_sakazakii_YP_001438839
Pectobacterium_atrosepticum_YP_049328
Erwinia_tasmaniensis_YP_001908369
Yersinia_pestis_ZP_02223456
Yersinia_pestis_CO92_NP_406570
Yersinia_pestis_KIM_NP_668426
Yersinia_pseudotuberculosis_YP_001401981
Serratia_proteamaculans_YP_001477389
Yersinia_pestis_Angola_YP_001605806

FIGURA 49G

```
                                                  ---•--
                                                     180
                                                  ---•-
TesA_P_Domains_without_Signal_Peptide             LVNHDS                                  182
EColi_1J00                                        LVNHDSLEHHHHRH                          190
EColi_1JRL                                        LVNHDSLEHHHHHH                          190
EColi_O157_NP_286243                              LVNHDS                                  208
Shigella_boydii_Sb227_YP_406934                   LVNHDS                                  208
EColi_O157_ZP_02799578                            LVNHDS                                  207
EColid_ZP_02902430                                LVNHDS                                  207
EColi_ZP_03081449                                 LVNHDS                                  197
Shigella_dysenteriae_YP_402105                    LVNHDS                                  208
Citrobacter_koseri_YP_001454190                   LVNHDS                                  197
Marine_metagenome_ECJ13936                        LVKHES                                  218
ABH77568_Sequence_7411_from_patent                LVNHDSSNS                               295
Enterobacter_cancerogenus_ZP_03281441             LVKHDS                                  197
AAR63009_Sequence_12726_from_patent               LVNHDS                                  467
Enterobacter_YP_001175709                         LVKHDS                                  208
Klebsiella_pneumoniae_YP_001334153                LVNHDS                                  197
Klebsiella_pneumoniae_YP_002240008                LVNHDS                                  207
Salmonella_enterica_NP_455101                     FLS                                     204
Salmonella_typhimurium_NP_459501                  FLS                                     204
Salmonella_enterica_YP_002225613                  FLS                                     204
Salmonella_enterica_YP_215534                     FLS                                     215
Salmonella_enterica_ZP_02344720                   FLS                                     204
Salmonella_enterica_ZP_02683026                   FLS                                     204
Salmonella_enterica_ZP_03163359                   FLS                                     204
Salmonella_enterica_ZP_03221362                   FLS                                     204
Salmonella_enterica_YP_001571431                  FLS                                     194
Klebsiella_ACC78298                               LDKHVS                                  272
Enterobacter_sakazakii_YP_001438839               LVKHDS                                  219
Pectobacterium_atrosepticum_YP_049328             LVNHES                                  227
Erwinia_tasmaniensis_YP_001908369                 LVKHEASRSVGNDG                          200
Yersinia_pestis_ZP_02223456                       LVVDPK                                  190
Yersinia_pestis_CO92_NP_406570                    LVVDPK                                  212
Yersinia_pestis_KIM_NP_668426                     LVVDPK                                  222
Yersinia_pseudotuberculosis_YP_00140198           LVVDPK                                  211
Serratia_proteamaculans_YP_001477389              LVKHESN                                 196
Yersinia_pestis_Angola_YP_001605806               LVVDSK                                  216
```

FIGURA 50A

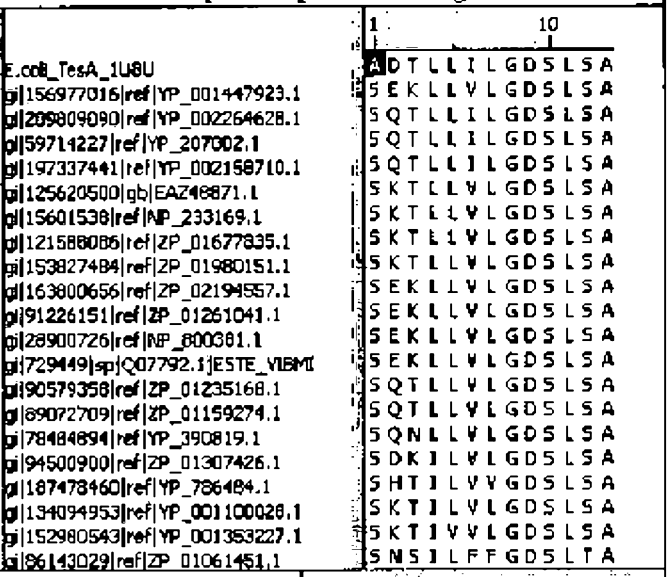
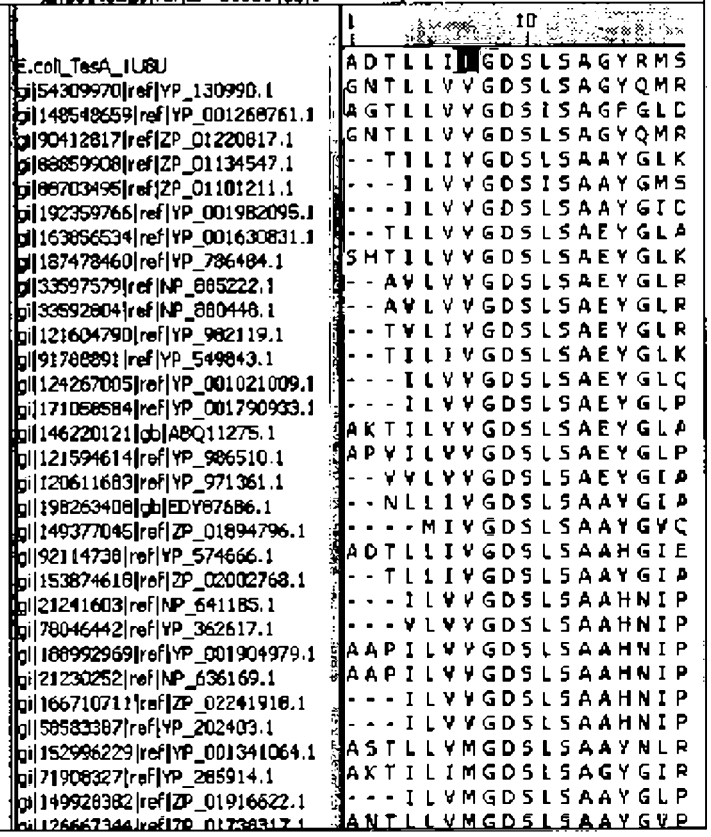
Resíduo	Mutações	*Alinhamento de seqüência próximo a região de interesse
A1	A1S	
L7	L7V, L7M	

FIGURA 50B

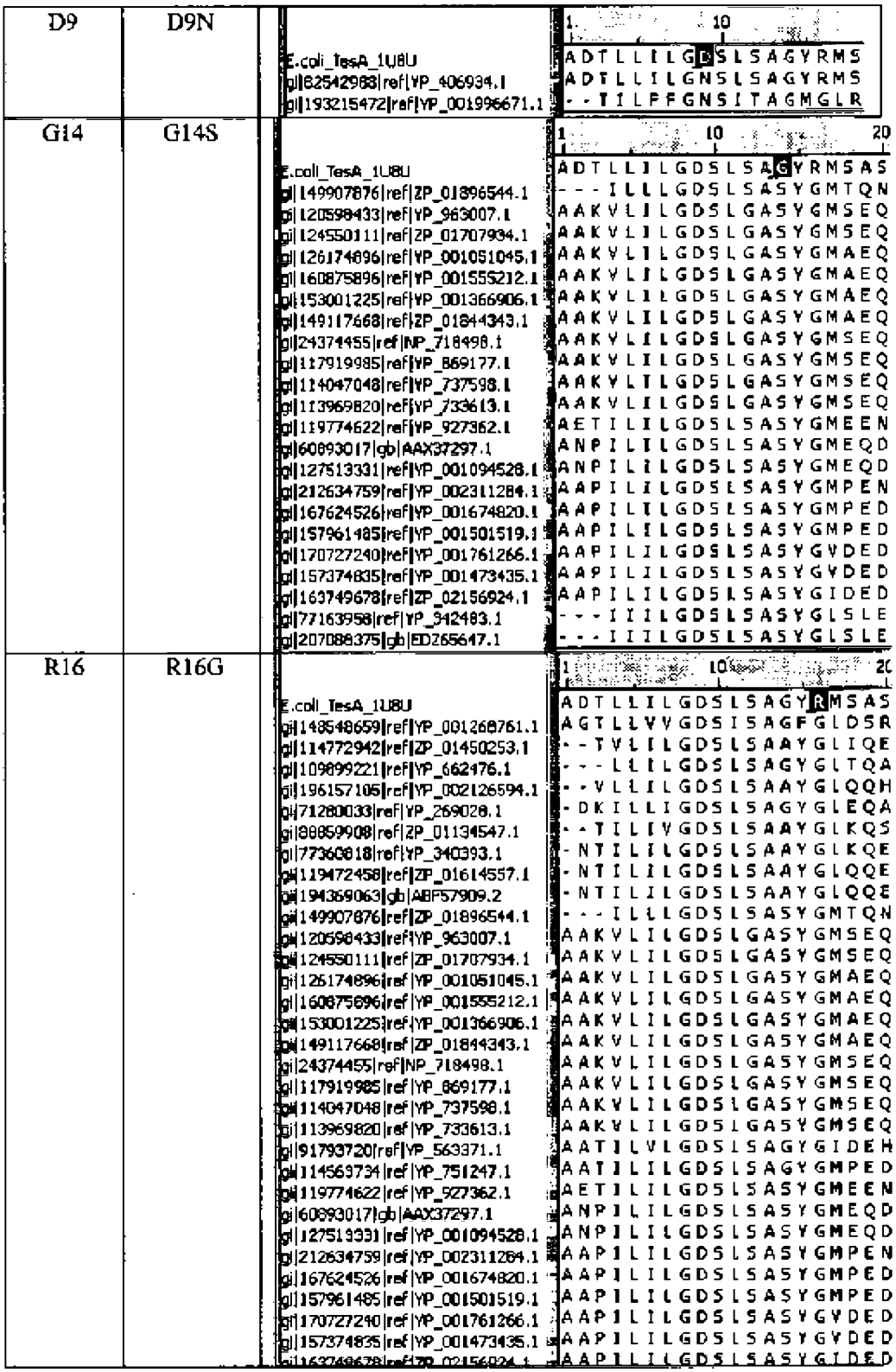

D9
D9N
G14
G14S
R16
R16G
E.coli_TesA_1U8U
gi|82542988|ref|YP_406934.1
gi|193215472|ref|YP_001996671.1
gi|149907876|ref|ZP_01896544.1
gi|120598433|ref|YP_963007.1
gi|124550111|ref|ZP_01707934.1
gi|126174896|ref|YP_001051045.1
gi|160875896|ref|YP_001555212.1
gi|153001225|ref|YP_001366906.1
gi|149117668|ref|ZP_01844343.1
gi|24374455|ref|NP_718498.1
gi|117919985|ref|YP_869177.1
gi|114047048|ref|YP_737598.1
gi|113969820|ref|YP_733613.1
gi|119774622|ref|YP_927362.1
gi|60893017|gb|AAX37297.1
gi|127513331|ref|YP_001094528.1
gi|212634759|ref|YP_002311284.1
gi|167624526|ref|YP_001674820.1
gi|157961485|ref|YP_001501519.1
gi|170727240|ref|YP_001761266.1
gi|157374835|ref|YP_001473435.1
gi|163749678|ref|ZP_02156924.1
gi|77163958|ref|YP_342483.1
gi|207088375|gb|EDZ65647.1
gi|148548659|ref|YP_001268761.1
gi|114772942|ref|ZP_01450253.1
gi|109899221|ref|YP_662476.1
gi|196157105|ref|YP_002126594.1
gi|71280033|ref|YP_269028.1
gi|88859908|ref|ZP_01134547.1
gi|77360818|ref|YP_340393.1
gi|119472458|ref|ZP_01614557.1
gi|194369063|gb|ABF57909.2
gi|91793720|ref|YP_563371.1
gi|114563734|ref|YP_751247.1

FIGURA 50C

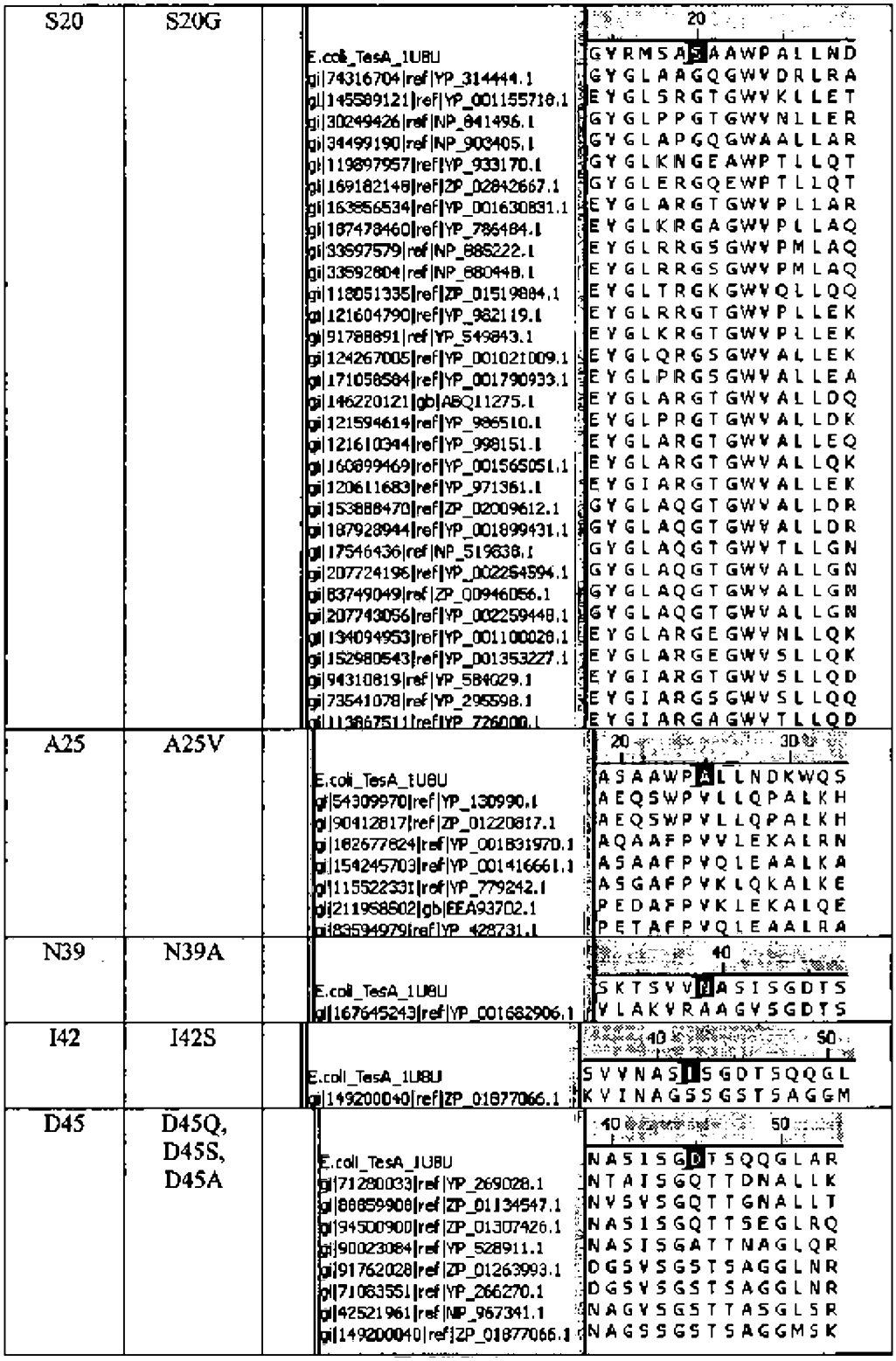

S20
S20G
A25
A25V
N39
N39A
I42
I42S
D45
D45Q,
D45S,
D45A
E.coli_TesA_1U8U
gi|74316704|ref|YP_314444.1
gi|145589121|ref|YP_001155718.1
gi|30249426|ref|NP_841496.1
gi|34499190|ref|NP_903405.1
gi|119897957|ref|YP_933170.1
gi|169182148|ref|ZP_02842667.1
gi|163856534|ref|YP_001630831.1
gi|187478460|ref|YP_786484.1
gi|33597579|ref|NP_885222.1
gi|33592804|ref|NP_880448.1
gi|118051335|ref|ZP_01519884.1
gi|121604790|ref|YP_982119.1
gi|91788891|ref|YP_549843.1
gi|124267005|ref|YP_001021009.1
gi|171058584|ref|YP_001790933.1
gi|146220121|gb|ABQ11275.1
gi|121594614|ref|YP_986510.1
gi|121610344|ref|YP_998151.1
gi|160899469|ref|YP_001565051.1
gi|120611683|ref|YP_971361.1
gi|153888470|ref|ZP_02009612.1
gi|187928944|ref|YP_001899431.1
gi|17546436|ref|NP_519838.1
gi|207724196|ref|YP_002254594.1
gi|83749049|ref|ZP_00946056.1
gi|207743056|ref|YP_002259448.1
gi|134094953|ref|YP_001100028.1
gi|152980543|ref|YP_001353227.1
gi|94310819|ref|YP_584029.1
gi|73541078|ref|YP_295598.1
gi|113867511|ref|YP_726000.1
gi|54309970|ref|YP_130990.1
gi|90412817|ref|ZP_01220817.1
gi|162677624|ref|YP_001831970.1
gi|154245703|ref|YP_001416661.1
gi|115522331|ref|YP_779242.1
gi|211958502|gb|EEA93702.1
gi|83594979|ref|YP_428731.1
gi|167645243|ref|YP_001682906.1
gi|149200040|ref|ZP_01877066.1
gi|71280033|ref|YP_269028.1
gi|88859908|ref|ZP_01134547.1
gi|94500900|ref|ZP_01307426.1
gi|90023084|ref|YP_528911.1
gi|91762028|ref|ZP_01263993.1
gi|71063551|ref|YP_266270.1
gi|42521961|ref|NP_967341.1

FIGURA 50D

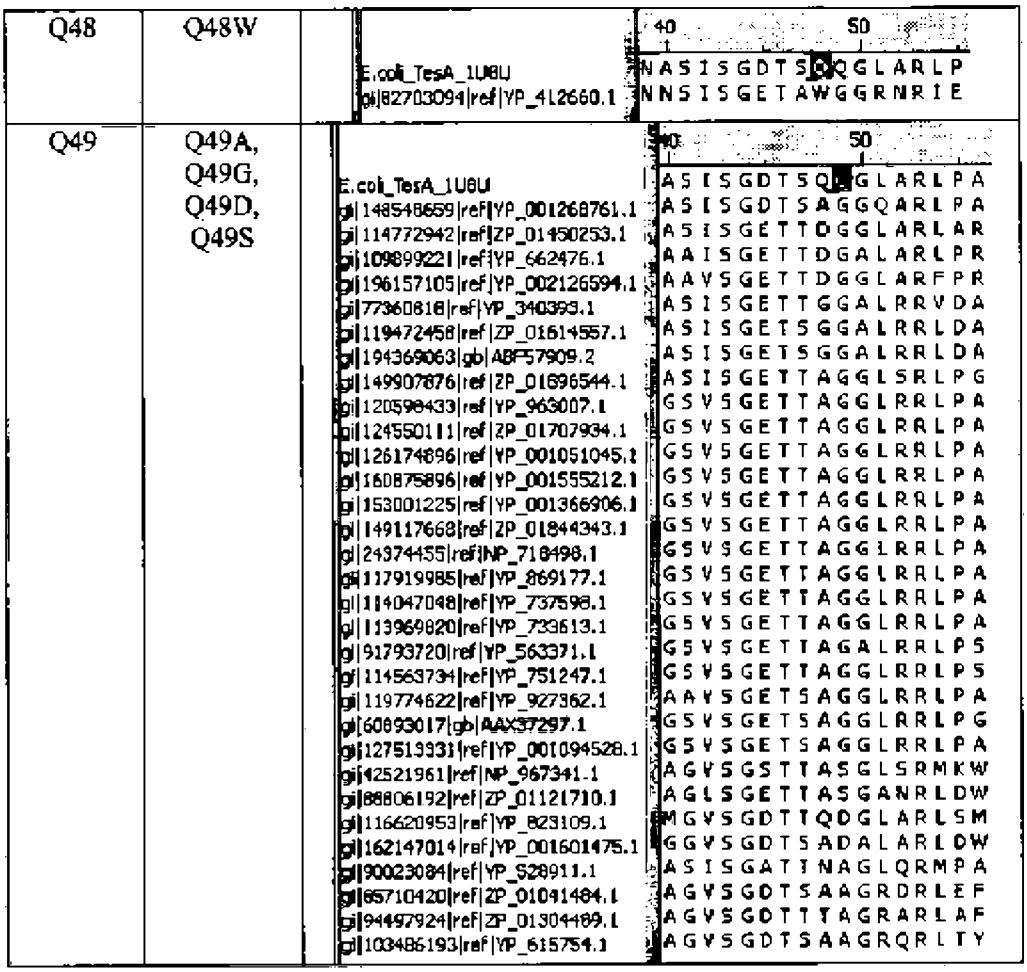

Q48
Q48W
Q49
Q49A, Q49G, Q49D, Q49S
E.coli_TesA_1U8U
gi|82703094|ref|YP_412660.1
40
50
NASISGDTSQQGLARLP
NNSISGETAWGGRNRIE
E.coli_TesA_1U8U
gi|148548659|ref|YP_001268761.1
gi|114772942|ref|ZP_01450253.1
gi|109899221|ref|YP_662476.1
gi|196157105|ref|YP_002126594.1
gi|77360818|ref|YP_340393.1
gi|119472458|ref|ZP_01614557.1
gi|194369063|gb|ABF57909.2
gi|149907876|ref|ZP_01696544.1
gi|120598433|ref|YP_963007.1
gi|124550111|ref|ZP_01707934.1
gi|126174896|ref|YP_001051045.1
gi|160875896|ref|YP_001555212.1
gi|153001225|ref|YP_001366906.1
gi|149117668|ref|ZP_01844343.1
gi|24374455|ref|NP_718498.1
gi|117919985|ref|YP_869177.1
gi|114047048|ref|YP_737598.1
gi|113969820|ref|YP_733613.1
gi|91793720|ref|YP_563371.1
gi|114563734|ref|YP_751247.1
gi|119774622|ref|YP_927362.1
gi|60893017|gb|AAX37297.1
gi|127513931|ref|YP_001094528.1
gi|42521961|ref|NP_967341.1
gi|88806192|ref|ZP_01121710.1
gi|116620953|ref|YP_823109.1
gi|162147014|ref|YP_001601475.1
gi|90023084|ref|YP_528911.1
gi|85710420|ref|ZP_01041484.1
gi|94497924|ref|ZP_01304489.1
gi|103486193|ref|YP_615754.1
40
50
ASISGDTSQQGLARLPA
ASISGDTSAGGQARLPA
ASISGETTDGGLARLAR
AAISGETTDGALARLPR
AAVSGETTDGGLARFPR
ASISGETTGGALRRVDA
ASISGETSGGALRRLDA
ASISGETSGGALRRLDA
ASISGETTAGGLSRLPG
GSVSGETTAGGLRRLPA
GSVSGETTAGGLRRLPA
GSVSGETTAGGLRRLPA
GSVSGETTAGGLRRLPA
GSVSGETTAGGLRRLPA
GSVSGETTAGGLRRLPA
GSVSGETTAGGLRRLPA
GSVSGETTAGGLRRLPA
GSVSGETTAGGLRRLPA
GSVSGETTAGGLRRLPA
GSVSGETTAGALRRLPS
GSVSGETTAGGLRRLPS
AAVSGETSAGGLRRLPA
GSVSGETSAGGLRRLPG
GSVSGETSAGGLRRLPA
AGVSGSTTASGLSRMKW
AGLSGETTASGANRLDW
MGVSGDTTQDGLARLSM
GGVSGDTSADALARLDW
ASISGATTNAGLQRMPA
AGVSGDTSAAGRDRLEF
AGVSGDTTTAGRARLAF
AGVSGDTSAAGRQRLTY

FIGURA 50E

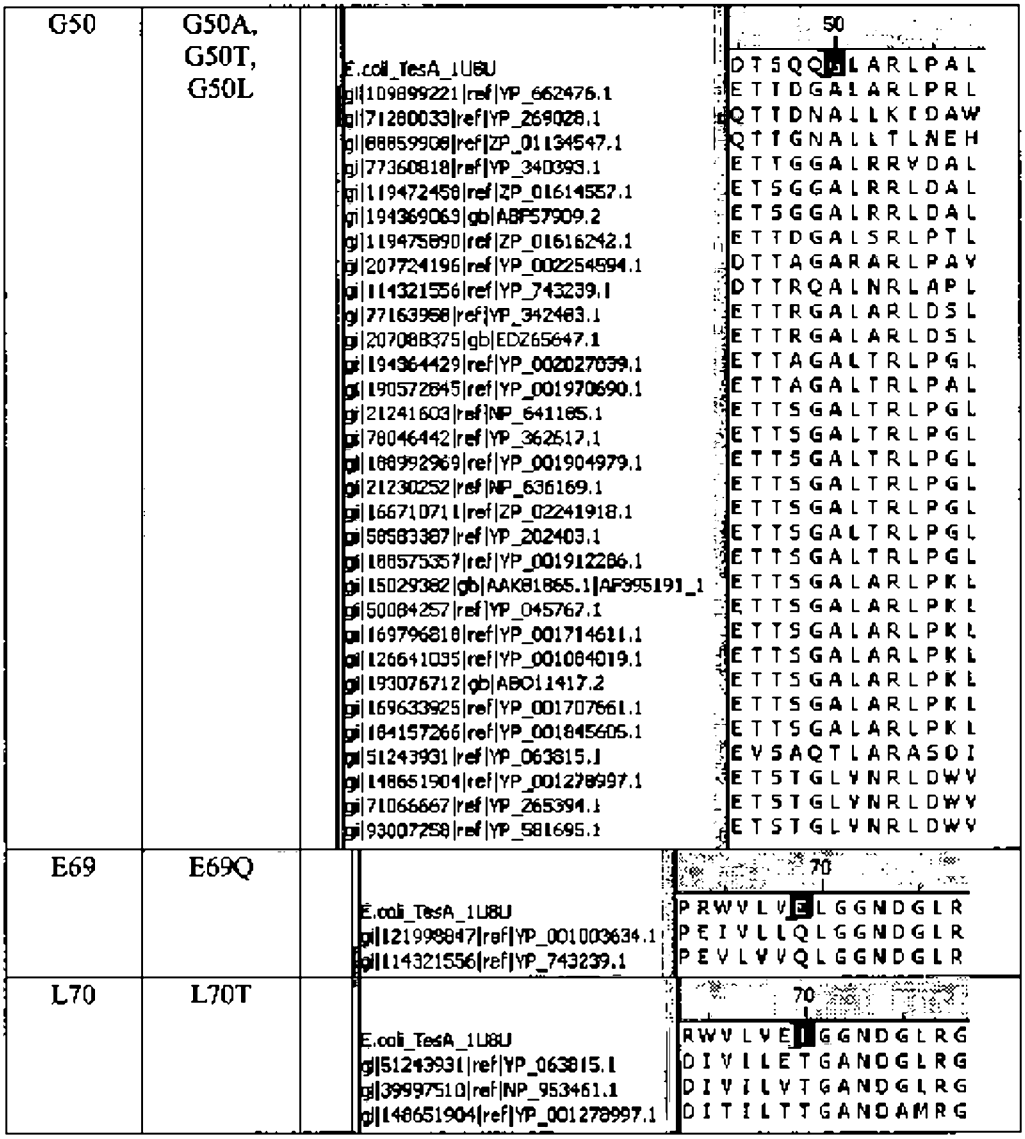

G50
G50A, G50T, G50L
E.coli_TesA_1U8U
gi|109899221|ref|YP_662476.1
gi|71280033|ref|YP_269028.1
gi|88859908|ref|ZP_01134547.1
gi|77360818|ref|YP_340393.1
gi|119472458|ref|ZP_01614557.1
gi|194369069|gb|ABF57909.2
gi|119475890|ref|ZP_01616242.1
gi|207724196|ref|YP_002254594.1
gi|114321556|ref|YP_743239.1
gi|77163958|ref|YP_342483.1
gi|207088375|gb|EDZ65647.1
gi|194364429|ref|YP_002027039.1
gi|190572645|ref|YP_001970690.1
gi|21241603|ref|NP_641185.1
gi|78046442|ref|YP_362517.1
gi|188992969|ref|YP_001904979.1
gi|21230252|ref|NP_636169.1
gi|166710711|ref|ZP_02241918.1
gi|50583387|ref|YP_202403.1
gi|188575357|ref|YP_001912286.1
gi|15029382|gb|AAK81865.1|AF395191_1
gi|50084257|ref|YP_045767.1
gi|169796818|ref|YP_001714611.1
gi|126641035|ref|YP_001084019.1
gi|193076712|gb|ABO11417.2
gi|169633925|ref|YP_001707661.1
gi|184157266|ref|YP_001845605.1
gi|51243931|ref|YP_063815.1
gi|148651904|ref|YP_001278997.1
gi|71066667|ref|YP_265394.1
gi|93007258|ref|YP_581695.1
50
DTSQQLARLPAL
ETTDGALARLPRL
QTTDNALLKDAW
QTTGNALLTLNEH
ETTGGALRRVDAL
ETSGGALRRLDAL
ETSGGALRRLDAL
ETTDGALSRLPTL
DTTAGARARLPAV
DTTRQALNRLAPL
ETTRGALARLDSL
ETTRGALARLDSL
ETTAGALTRLPGL
ETTAGALTRLPAL
ETTSGALTRLPGL
ETTSGALTRLPGL
ETTSGALTRLPGL
ETTSGALTRLPGL
ETTSGALTRLPGL
ETTSGALTRLPGL
ETTSGALARLPKL
ETTSGALARLPKL
ETTSGALARLPKL
ETTSGALARLPKL
ETTSGALARLPKL
ETTSGALARLPKL
ETTSGALARLPKL
EVSAQTLARASDI
ETSTGLVNRLDWV
ETSTGLVNRLDWV
ETSTGLVNRLDWV
E69
E69Q
E.coli_TesA_1U8U
gi|121998847|ref|YP_001003634.1
gi|114321556|ref|YP_743239.1
70
PRWVLVELGGNDGLR
PEIVLLQLGGNDGLR
PEVLVVQLGGNDGLR
L70
L70T
E.coli_TesA_1U8U
gi|51243931|ref|YP_063815.1
gi|39997510|ref|NP_953461.1
gi|148651904|ref|YP_001278997.1
70
RWVLVELGGNDGLRG
DIVILETGANDGLRG
DIVILVTGANDGLRG
DITILTTGANDAMRG

FIGURA 50F

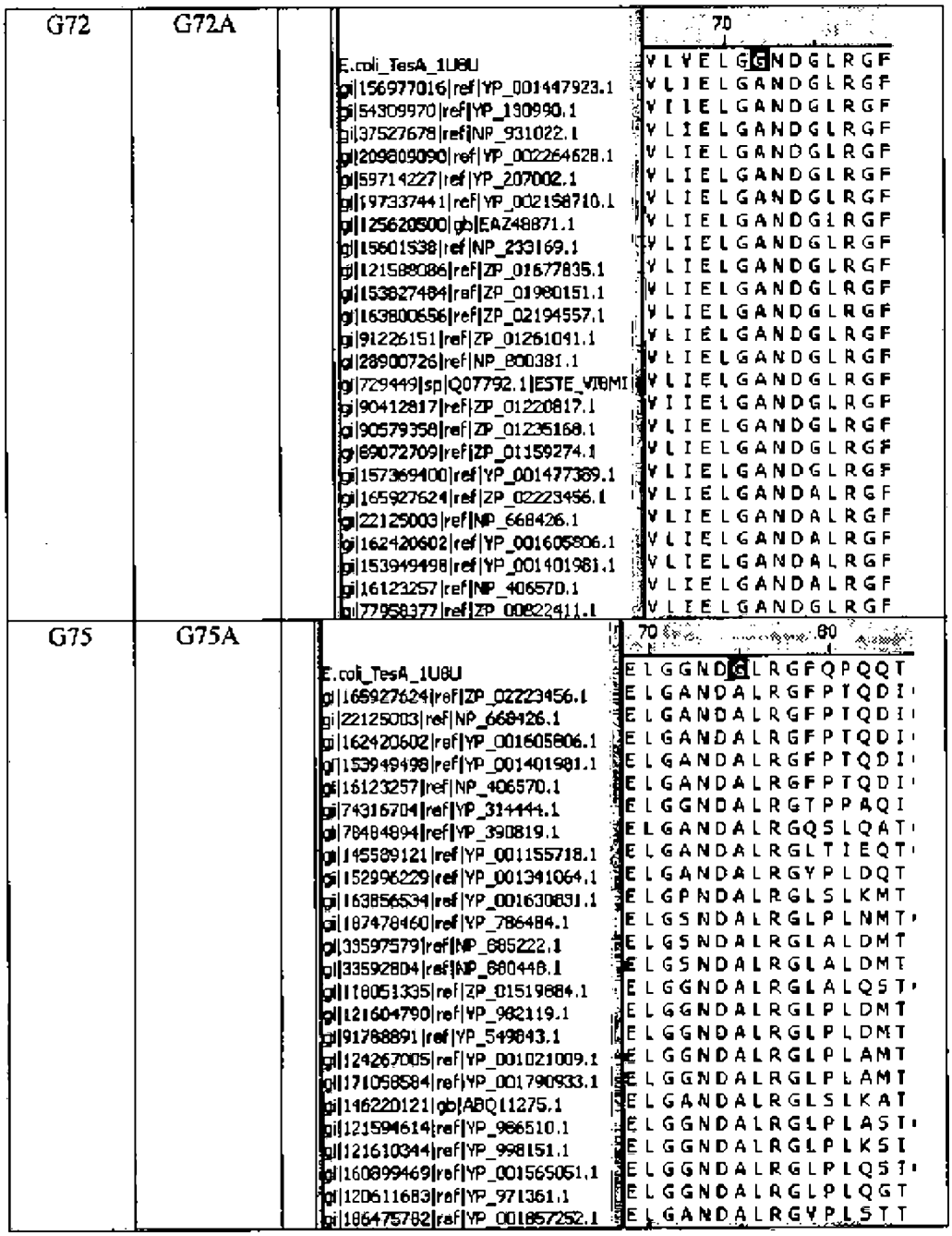

G72
G72A
70
E.coli_TesA_1U8U
gi|156977016|ref|YP_001447923.1
gi|54309970|ref|YP_130990.1
gi|37527678|ref|NP_931022.1
gi|209809090|ref|YP_002264628.1
gi|59714227|ref|YP_207002.1
gi|197337441|ref|YP_002158710.1
gi|125620500|gb|EAZ48871.1
gi|15601538|ref|NP_233169.1
gi|121589086|ref|ZP_01677835.1
gi|153827484|ref|ZP_01980151.1
gi|163800656|ref|ZP_02194557.1
gi|91226151|ref|ZP_01261041.1
gi|28900726|ref|NP_800381.1
gi|729449|sp|Q07792.1|ESTE_VIBMI
gi|90412817|ref|ZP_01220817.1
gi|90579358|ref|ZP_01235168.1
gi|89072709|ref|ZP_01159274.1
gi|157369400|ref|YP_001477389.1
gi|165927624|ref|ZP_02223456.1
gi|22125003|ref|NP_668426.1
gi|162420602|ref|YP_001605806.1
gi|153949498|ref|YP_001401981.1
gi|16123257|ref|NP_406570.1
gi|77958377|ref|ZP_00822411.1
VLYELGGNDGLRGF
VLIELGANDGLRGF
VIIELGANDGLRGF
VLIELGANDGLRGF
VLIELGANDGLRGF
VLIELGANDGLRGF
VLIELGANDGLRGF
VLIELGANDGLRGF
VLIELGANDGLRGF
VLIELGANDGLRGF
VLIELGANDGLRGF
VLIELGANDGLRGF
VLIELGANDGLRGF
VLIELGANDGLRGF
VIIELGANDGLRGF
VLIELGANDGLRGF
VLIELGANDGLRGF
VLIELGANDGLRGF
VLIELGANDALRGF
VLIELGANDALRGF
VLIELGANDALRGF
VLIELGANDALRGF
VLIELGANDALRGF
VLIELGANDGLRGF
G75
G75A
70
80
E.coli_TesA_1U8U
gi|165927624|ref|ZP_02223456.1
gi|22125003|ref|NP_668426.1
gi|162420602|ref|YP_001605806.1
gi|153949498|ref|YP_001401981.1
gi|16123257|ref|NP_406570.1
gi|74316704|ref|YP_314444.1
gi|78484894|ref|YP_390819.1
gi|145589121|ref|YP_001155718.1
gi|152996229|ref|YP_001341064.1
gi|163856534|ref|YP_001630831.1
gi|187478460|ref|YP_786484.1
gi|33597579|ref|NP_885222.1
gi|33592804|ref|NP_880448.1
gi|118051335|ref|ZP_01519684.1
gi|121604790|ref|YP_982119.1
gi|91788891|ref|YP_549843.1
gi|124267005|ref|YP_001021009.1
gi|171058584|ref|YP_001790933.1
gi|146220121|gb|ABQ11275.1
gi|121594614|ref|YP_986510.1
gi|121610344|ref|YP_998151.1
gi|160899469|ref|YP_001565051.1
gi|120611683|ref|YP_971361.1
gi|186475782|ref|YP_001857252.1
ELGGNDGLRGFQPQQT
ELGANDALRGFPTQDI
ELGANDALRGFPTQDI
ELGANDALRGFPTQDI
ELGANDALRGFPTQDI
ELGGNDALRGTPPAQI
ELGANDALRGQSLQAT
ELGANDALRGLTIEQT
ELGANDALRGYPLDQT
ELGPNDALRGLSLKMT
ELGSNDALRGLPLNMT
ELGSNDALRGLALDMT
ELGSNDALRGLALDMT
ELGGNDALRGLALQST
ELGGNDALRGLPLDMT
ELGGNDALRGLPLDMT
ELGGNDALRGLPLAMT
ELGGNDALRGLPLAMT
ELGANDALRGLSLKAT
ELGGNDALRGLPLAST
ELGGNDALRGLPLKSI
ELGGNDALRGLPLQST
ELGGNDALRGLPLQGT
ELGANDALRGVPLSTT

FIGURA 50G

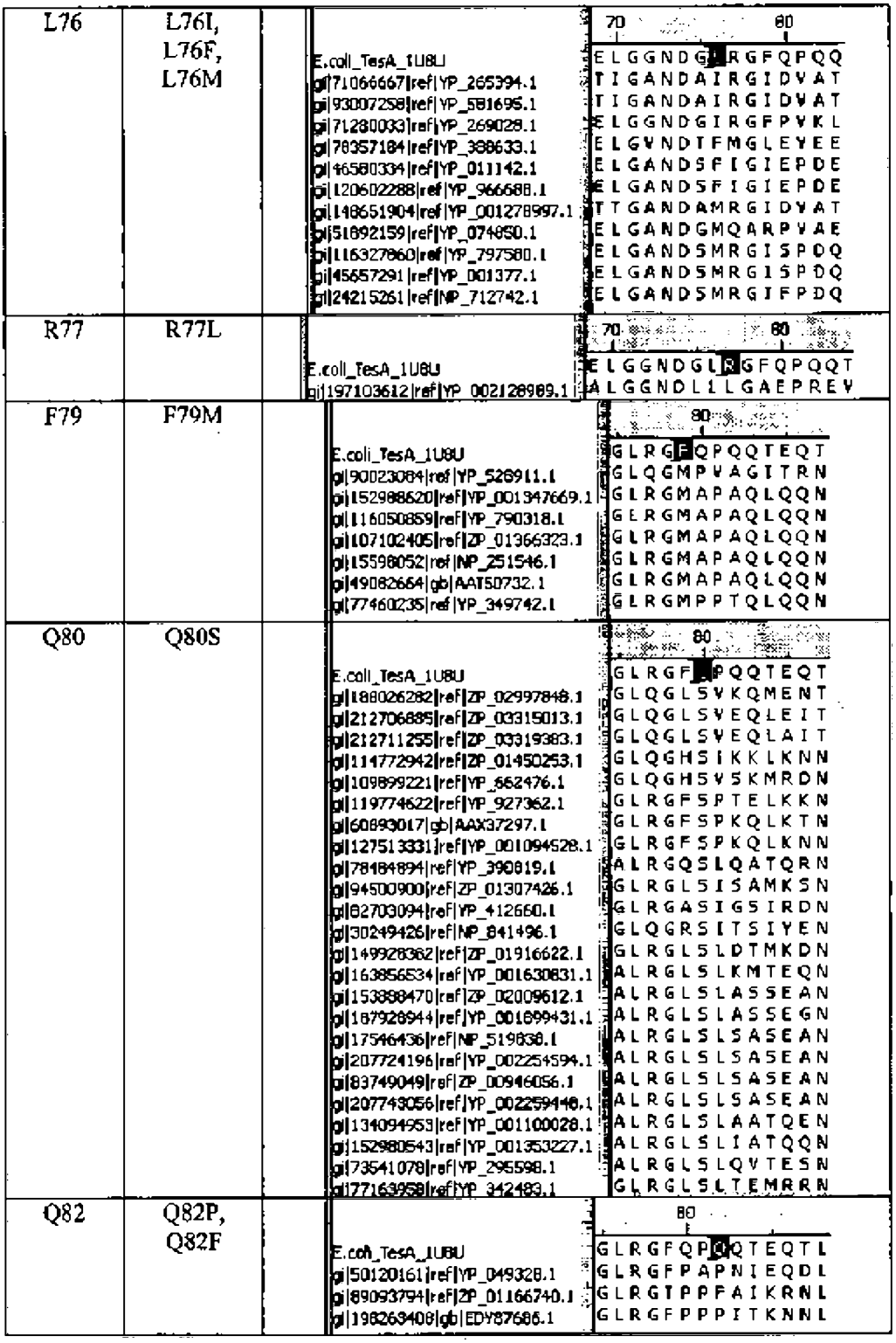


FIGURA 50H

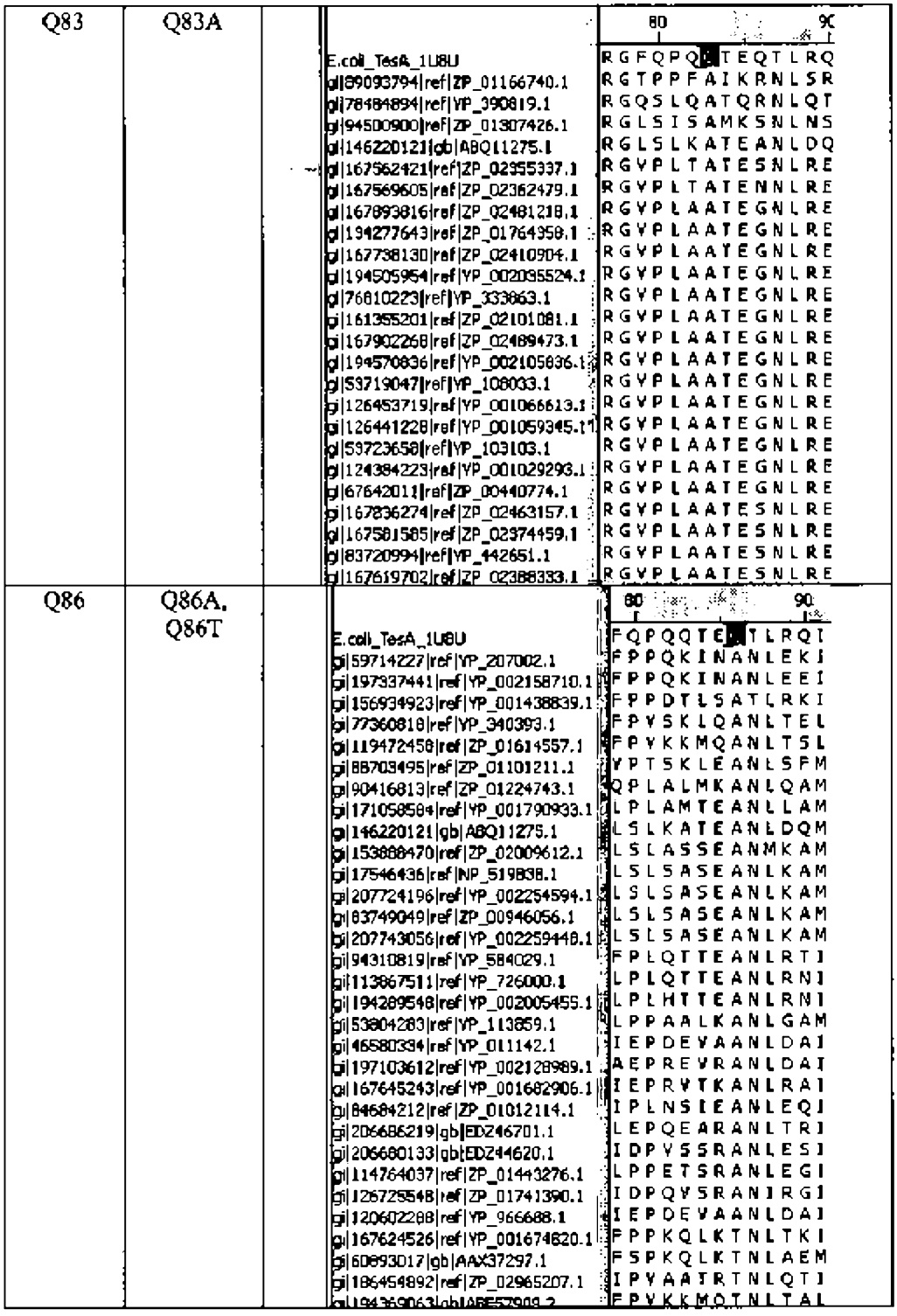

Q83
Q83A
Q86
Q86A,
Q86T
80
90
E.coli_TesA_1U8U
gi|89093794|ref|ZP_01166740.1
gi|78484894|ref|YP_390819.1
gi|94500900|ref|ZP_01307426.1
gi|146220121|gb|ABQ11275.1
gi|167562421|ref|ZP_02355337.1
gi|167569605|ref|ZP_02362479.1
gi|167893816|ref|ZP_02481218.1
gi|194277643|ref|ZP_01764958.1
gi|167738130|ref|ZP_02410904.1
gi|194505954|ref|YP_002095524.1
gi|76810223|ref|YP_333863.1
gi|161355201|ref|ZP_02101081.1
gi|167902268|ref|ZP_02489473.1
gi|194570836|ref|YP_002105836.1
gi|53719047|ref|YP_108033.1
gi|126453719|ref|YP_001066613.1
gi|126441228|ref|YP_001059345.1
gi|53723658|ref|YP_103103.1
gi|124384223|ref|YP_001029293.1
gi|67642011|ref|ZP_00440774.1
gi|167836274|ref|ZP_02463157.1
gi|167581585|ref|ZP_02374459.1
gi|83720994|ref|YP_442651.1
gi|167619702|ref|ZP_02388333.1
RGFQPQTEQTLRQ
RGTPPFAIKRNLSR
RGQSLQATQRNLQT
RGLSISAMKSNLNS
RGLSLKATEANLDQ
RGVPLTATESNLRE
RGVPLTATENNLRE
RGVPLAATEGNLRE
RGVPLAATEGNLRE
RGVPLAATEGNLRE
RGVPLAATEGNLRE
RGVPLAATEGNLRE
RGVPLAATEGNLRE
RGVPLAATEGNLRE
RGVPLAATEGNLRE
RGVPLAATEGNLRE
RGVPLAATEGNLRE
RGVPLAATEGNLRE
RGVPLAATESNLRE
RGVPLAATESNLRE
RGVPLAATESNLRE
RGVPLAATESNLRE
E.coli_TesA_1U8U
gi|59714227|ref|YP_207002.1
gi|197337441|ref|YP_002158710.1
gi|156934923|ref|YP_001438839.1
gi|77360818|ref|YP_340393.1
gi|119472458|ref|ZP_01614557.1
gi|88703495|ref|ZP_01101211.1
gi|90416813|ref|ZP_01224743.1
gi|171058584|ref|YP_001790933.1
gi|146220121|gb|ABQ11275.1
gi|153888470|ref|ZP_02009612.1
gi|17546436|ref|NP_519838.1
gi|207724196|ref|YP_002254594.1
gi|83749049|ref|ZP_00946056.1
gi|207743056|ref|YP_002259448.1
gi|94310819|ref|YP_584029.1
gi|113867511|ref|YP_726000.1
gi|194289548|ref|YP_002005455.1
gi|53804283|ref|YP_113859.1
gi|46580334|ref|YP_011142.1
gi|197103612|ref|YP_002128989.1
gi|167645243|ref|YP_001682906.1
gi|84684212|ref|ZP_01012114.1
gi|206686219|gb|EDZ46701.1
gi|206660133|gb|EDZ44620.1
gi|114764037|ref|ZP_01443276.1
gi|126729548|ref|ZP_01741390.1
gi|120602288|ref|YP_966688.1
gi|167624526|ref|YP_001674820.1
gi|60693017|gb|AAX37297.1
gi|186454892|ref|ZP_02965207.1
FQPQQTETLRQI
FPPQKINANLEKI
FPPQKINANLEEI
FPPDTLSATLRKI
FPVSKLQANLTEL
FPVKKMQANLTSL
YPTSKLEANLSFM
QPLALMKANLQAM
LPLAMTEANLLAM
LSLKATEANLDQM
LSLASSEANMKAM
LSLSASEANLKAM
LSLSASEANLKAM
LSLSASEANLKAM
LSLSASEANLKAM
FPLQTTEANLRTI
LPLQTTEANLRNI
LPLHTTEANLRNI
LPPAALKANLGAM
IEPDEVAANLDAI
AEPREVRANLDAI
IEPRVTKANLRAI
IPLNSIEANLEQI
LEPQEARANLTRI
IDPVSSRANLESI
LPPETSRANLEGI
IDPQVSRANIRGI
IEPDEVAANLDAI
FPPKQLKTNLTKI
FSPKQLKTNLAEM
IPVAATRTNLQTI

FIGURA 50I

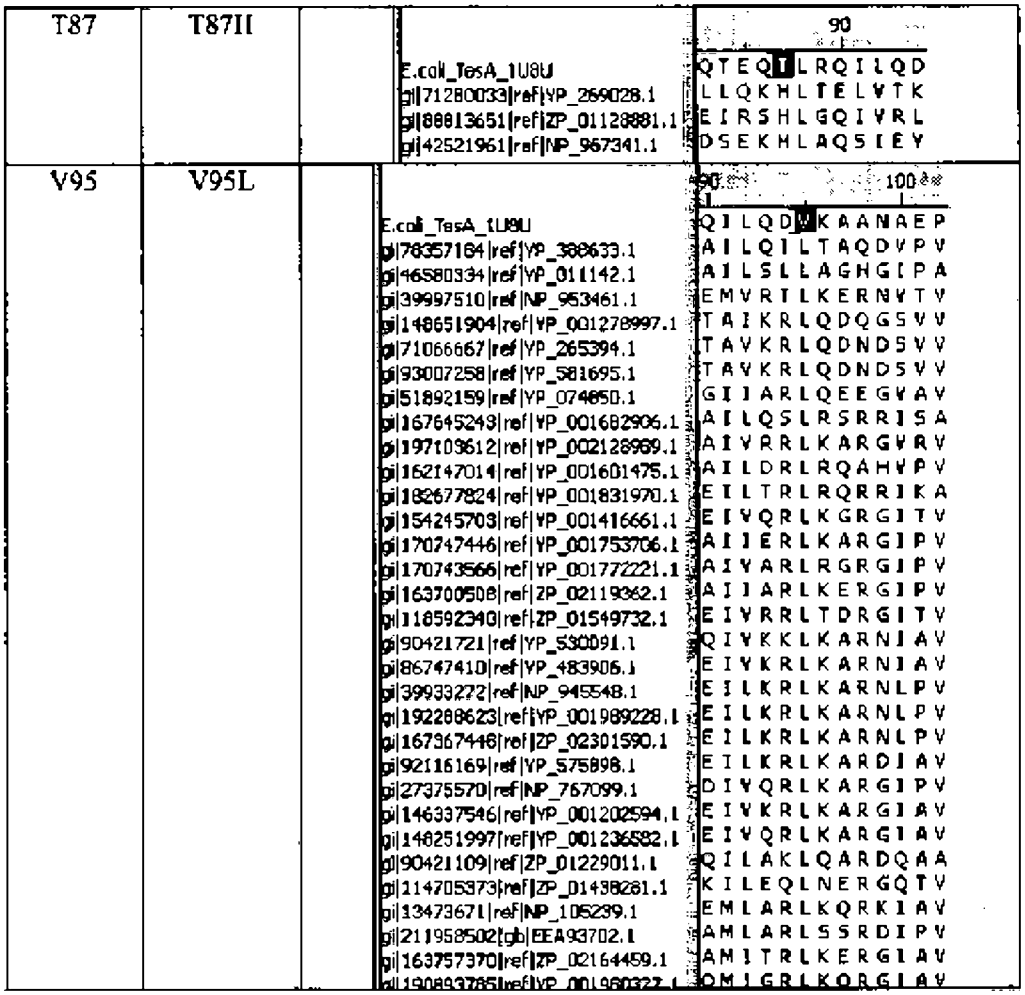

T87
T87I
E.coli_TesA_1U8U
gi|71280033|ref|YP_269028.1
gi|88813651|ref|ZP_01128881.1
gi|42521961|ref|NP_967341.1
90
QTEQTLRQILQD
LLQKHLTELVTK
EIRSHLGQIVRL
DSEKHLAQSIEY
V95
V95L
E.coli_TesA_1U8U
gi|78357184|ref|YP_388633.1
gi|46580334|ref|YP_011142.1
gi|39997510|ref|NP_953461.1
gi|148651904|ref|YP_001278997.1
gi|71066667|ref|YP_265394.1
gi|93007258|ref|YP_581695.1
gi|51892159|ref|YP_074850.1
gi|167645243|ref|YP_001682906.1
gi|197103612|ref|YP_002128969.1
gi|162147014|ref|YP_001601475.1
gi|182677824|ref|YP_001831970.1
gi|154245703|ref|YP_001416661.1
gi|170747446|ref|YP_001753706.1
gi|170743566|ref|YP_001772221.1
gi|163700508|ref|ZP_02119362.1
gi|118592340|ref|ZP_01549732.1
gi|90421721|ref|YP_530091.1
gi|86747410|ref|YP_483906.1
gi|39933272|ref|NP_945548.1
gi|192288623|ref|YP_001989228.1
gi|167967446|ref|ZP_02301590.1
gi|92116169|ref|YP_575898.1
gi|27375570|ref|NP_767099.1
gi|146337546|ref|YP_001202594.1
gi|148251997|ref|YP_001236582.1
gi|90421109|ref|ZP_01229011.1
gi|114705373|ref|ZP_01438281.1
gi|13473671|ref|NP_105239.1
gi|211958502|gb|EEA93702.1
gi|163757370|ref|ZP_02164459.1
90
100
QILQDVKAANAEP
AILQILTAQDVPV
AILSLLAGHGIPA
EMVRILKERNVTV
TAIKRLQDQGSVV
TAVKRLQDNDSVV
TAVKRLQDNDSVV
GIIARLQEEGVAV
AILQSLRSRRISA
AIVRRLKARGVRV
AILDRLRQAHVPV
EILTRLRQRRIKA
EIVQRLKGRGITV
AIIERLKARGIPV
AIVARLRGRGIPV
AIIARLKERGIPV
EIVRRLTDRGITV
QIVKKLKARNIAV
EIVKRLKARNIAV
EILKRLKARNLPV
EILKRLKARNLPV
EILKRLKARNLPV
EILKRLKARDIAV
DIVQRLKARGIPV
EIVKRLKARGIAV
EIVQRLKARGIAV
QILAKLQARDQAA
KILEQLNERGQTV
EMLARLKQRKIAV
AMLARLSSRDIPV
AMITRLKERGIAV

FIGURA 50J

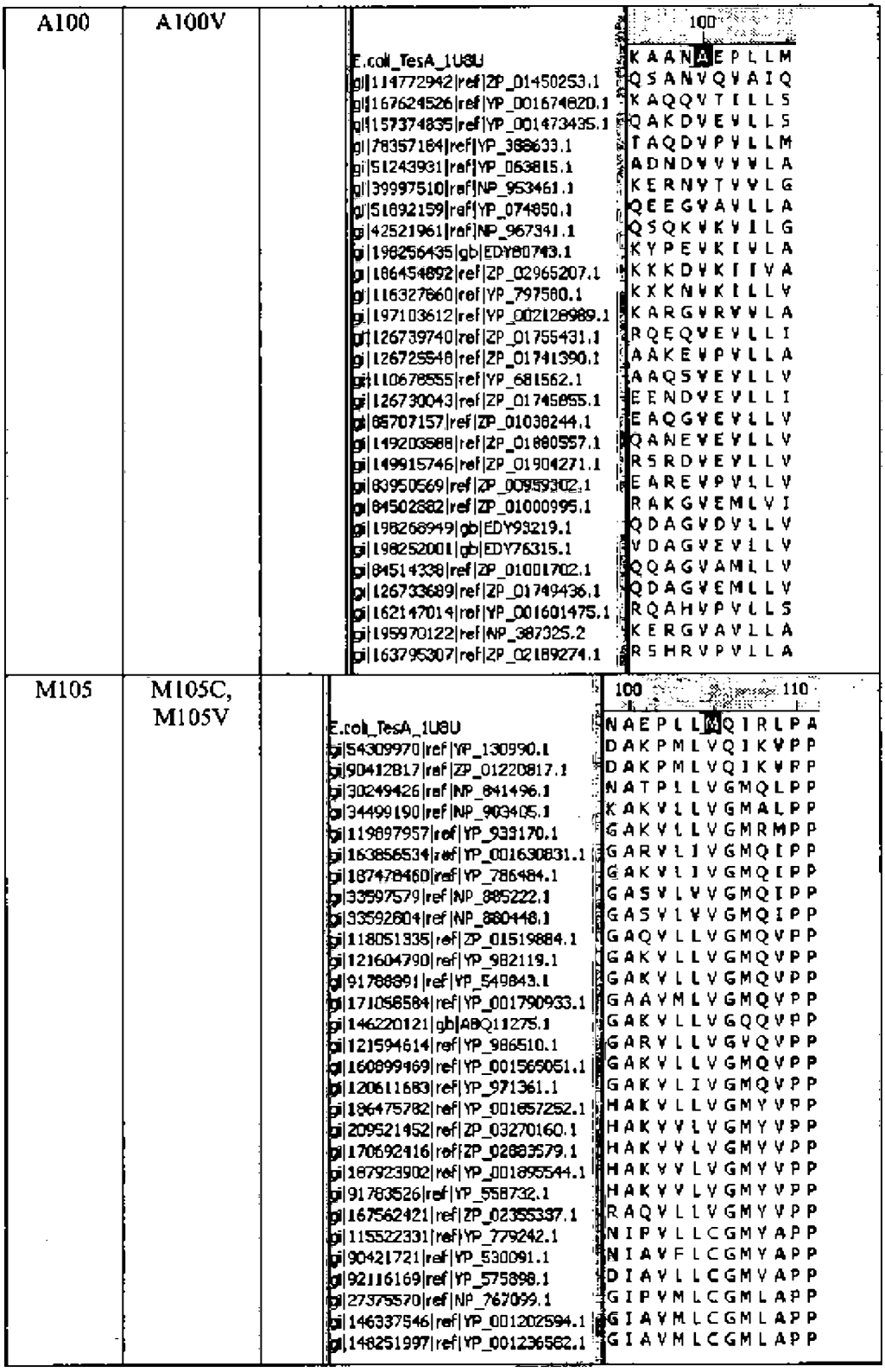

A100
A100V
M105
M105C, M105V
100
110
E.coli_TesA_1U8U
gi|114772942|ref|ZP_01450253.1
gi|167624526|ref|YP_001674020.1
gi|157374835|ref|YP_001473435.1
gi|78357184|ref|YP_388633.1
gi|51243931|ref|YP_063815.1
gi|39997510|ref|NP_953461.1
gi|51092159|ref|YP_074850.1
gi|42521961|ref|NP_967341.1
gi|198256435|gb|EDY80743.1
gi|186454892|ref|ZP_02965207.1
gi|116327660|ref|YP_797580.1
gi|197103612|ref|YP_002128989.1
gi|126739740|ref|ZP_01755431.1
gi|126725548|ref|ZP_01741390.1
gi|110678555|ref|YP_681562.1
gi|126730043|ref|ZP_01745855.1
gi|86707157|ref|ZP_01036244.1
gi|149203588|ref|ZP_01880557.1
gi|149915746|ref|ZP_01904271.1
gi|83950569|ref|ZP_00959302.1
gi|84502882|ref|ZP_01000995.1
gi|198268949|gb|EDY93219.1
gi|198252001|gb|EDY76315.1
gi|84514338|ref|ZP_01001702.1
gi|126733689|ref|ZP_01749436.1
gi|162147014|ref|YP_001601475.1
gi|195970122|ref|NP_387325.2
gi|163795307|ref|ZP_02189274.1
E.coli_TesA_1U8U
gi|54309970|ref|YP_130990.1
gi|90412817|ref|ZP_01220817.1
gi|30249426|ref|NP_841496.1
gi|34499190|ref|NP_903405.1
gi|119897957|ref|YP_933170.1
gi|163856534|ref|YP_001630831.1
gi|187478460|ref|YP_786484.1
gi|33597579|ref|NP_885222.1
gi|33592604|ref|NP_880448.1
gi|118051335|ref|ZP_01519884.1
gi|121604790|ref|YP_982119.1
gi|91788891|ref|YP_549843.1
gi|171056584|ref|YP_001790933.1
gi|146220121|gb|ABQ11275.1
gi|121594614|ref|YP_986510.1
gi|160899469|ref|YP_001565051.1
gi|120611683|ref|YP_971361.1
gi|186475782|ref|YP_001657252.1
gi|209521452|ref|ZP_03270160.1
gi|170692416|ref|ZP_02883579.1
gi|187923902|ref|YP_001895544.1
gi|91783526|ref|YP_558732.1
gi|167562421|ref|ZP_02355337.1
gi|115522331|ref|YP_779242.1
gi|90421721|ref|YP_530091.1
gi|92116169|ref|YP_575898.1
gi|27375570|ref|NP_767099.1
gi|146337546|ref|YP_001202594.1
gi|148251997|ref|YP_001236582.1

FIGURA 50L

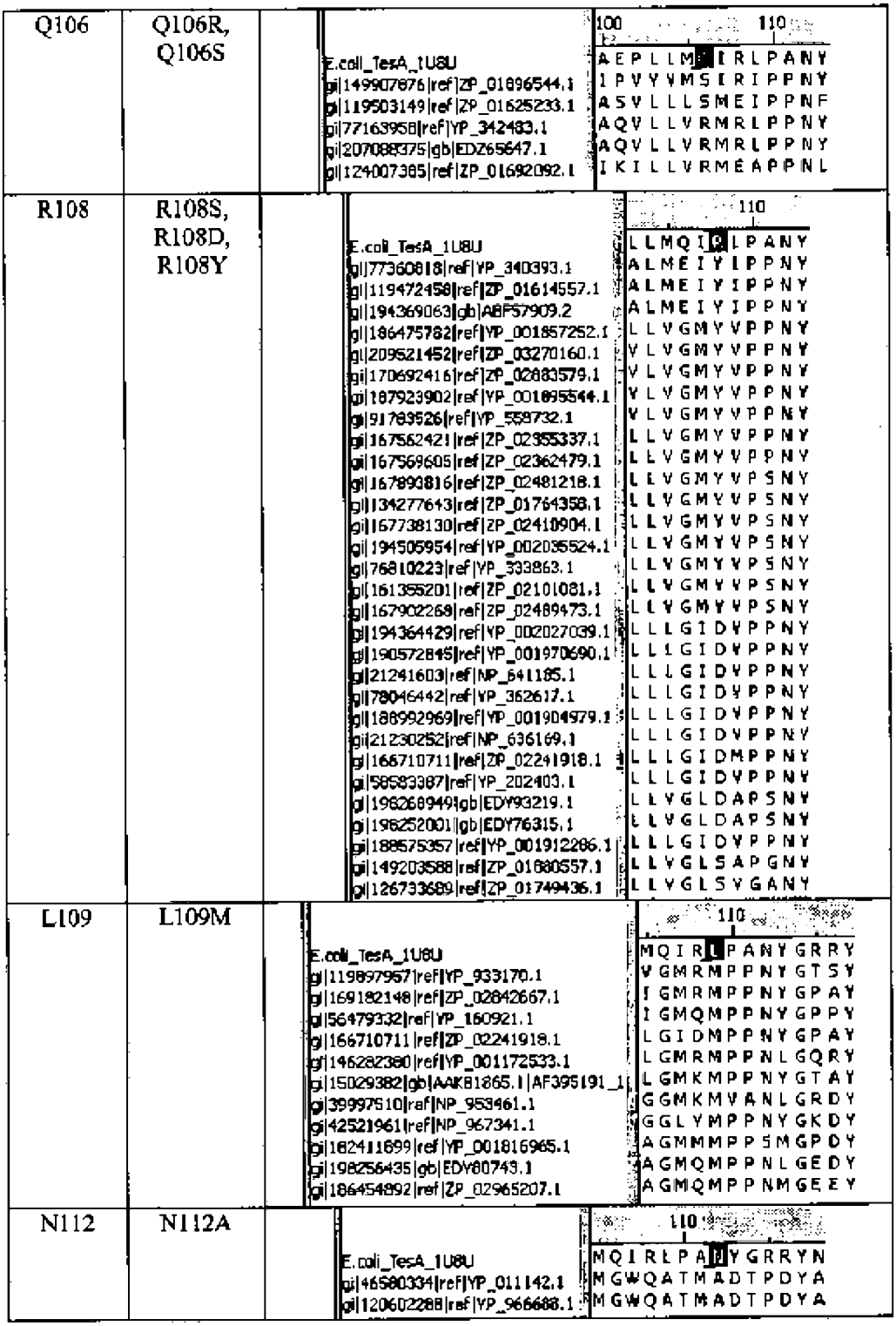

Q106
Q106R, Q106S
R108
R108S, R108D, R108Y
L109
L109M
N112
N112A
E.coli_TesA_1U8U
gi|149907876|ref|ZP_01896544.1
gi|119503149|ref|ZP_01625233.1
gi|77163958|ref|YP_342483.1
gi|207088375|gb|EDZ65647.1
gi|124007385|ref|ZP_01692092.1
gi|77360818|ref|YP_340393.1
gi|119472458|ref|ZP_01614557.1
gi|194369063|gb|ABF57909.2
gi|186475782|ref|YP_001857252.1
gi|209521452|ref|ZP_03270160.1
gi|170692416|ref|ZP_02883579.1
gi|187923902|ref|YP_001895544.1
gi|91789526|ref|YP_559732.1
gi|167562421|ref|ZP_02355337.1
gi|167569605|ref|ZP_02362479.1
gi|167893816|ref|ZP_02481218.1
gi|134277643|ref|ZP_01764358.1
gi|167738130|ref|ZP_02410904.1
gi|194505954|ref|YP_002035524.1
gi|76810223|ref|YP_333863.1
gi|161355201|ref|ZP_02101081.1
gi|167902268|ref|ZP_02489473.1
gi|194364429|ref|YP_002027039.1
gi|190572845|ref|YP_001970690.1
gi|21241603|ref|NP_641185.1
gi|78046442|ref|YP_362617.1
gi|188992969|ref|YP_001904979.1
gi|21230252|ref|NP_636169.1
gi|166710711|ref|ZP_02241918.1
gi|58583387|ref|YP_202403.1
gi|196268949|gb|EDY93219.1
gi|196252001|gb|EDY76315.1
gi|188575357|ref|YP_001912286.1
gi|149203588|ref|ZP_01880557.1
gi|126733689|ref|ZP_01749436.1
gi|119897957|ref|YP_933170.1
gi|169182148|ref|ZP_02842667.1
gi|56479332|ref|YP_160921.1
gi|146282380|ref|YP_001172533.1
gi|15029382|gb|AAKB1865.1|AF395191_1
gi|39997510|ref|NP_953461.1
gi|42521961|ref|NP_967341.1
gi|182411699|ref|YP_001816965.1
gi|198256435|gb|EDY80743.1
gi|186454892|ref|ZP_02965207.1
gi|46580334|ref|YP_011142.1
gi|120602288|ref|YP_966688.1

FIGURA 50M

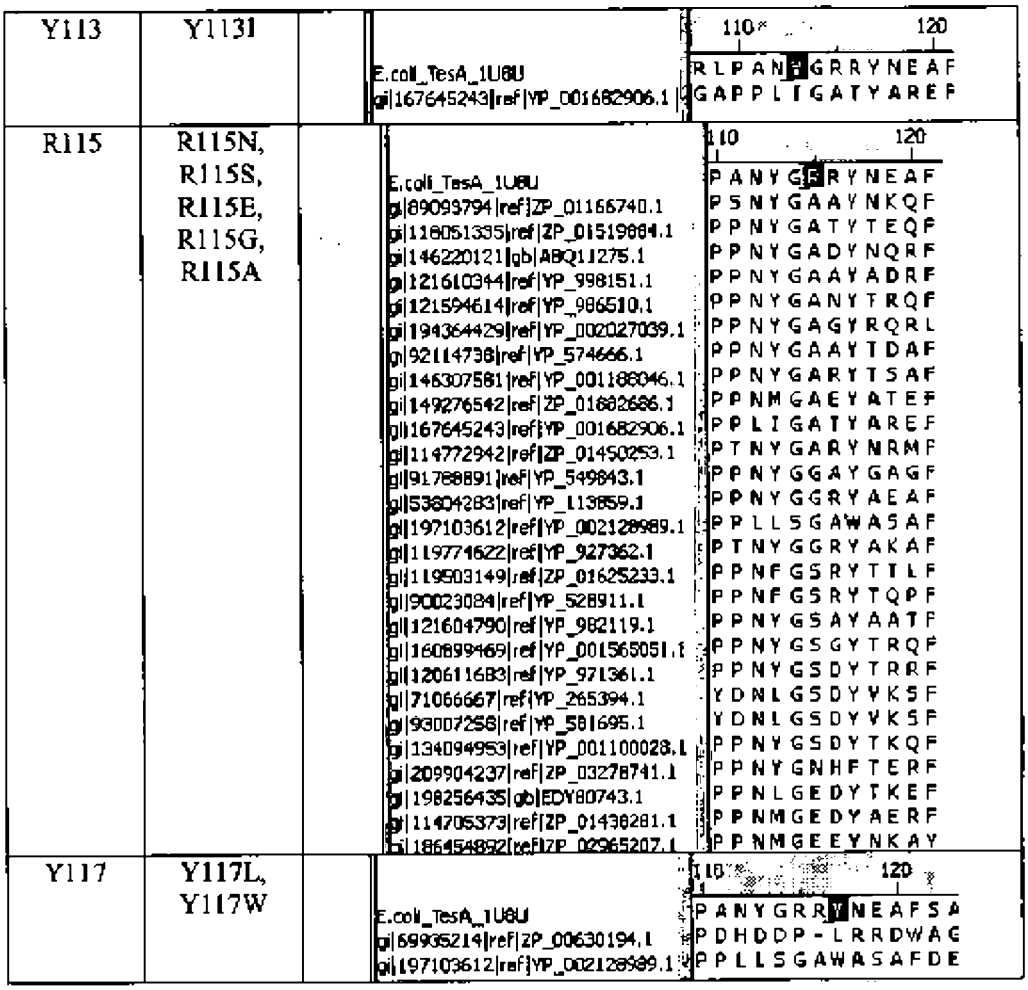

Y113
Y113I
E.coli_TesA_1U8U
gi|167645243|ref|YP_001682906.1
110
120
RLPANFGRRYNEAF
GAPPLIGATYAREF
R115
R115N, R115S, R115E, R115G, R115A
E.coli_TesA_1U8U
gi|89093794|ref|ZP_01166740.1
gi|118051335|ref|ZP_01519084.1
gi|146220121|gb|ABQ11275.1
gi|121610344|ref|YP_998151.1
gi|121594614|ref|YP_986510.1
gi|194364429|ref|YP_002027039.1
gi|92114738|ref|YP_574666.1
gi|146307581|ref|YP_001188046.1
gi|149276542|ref|ZP_01682686.1
gi|167645243|ref|YP_001682906.1
gi|114772942|ref|ZP_01450253.1
gi|91788891|ref|YP_549843.1
gi|53804283|ref|YP_113859.1
gi|197103612|ref|YP_002128989.1
gi|119774622|ref|YP_927362.1
gi|119503149|ref|ZP_01625233.1
gi|90023084|ref|YP_528911.1
gi|121604790|ref|YP_982119.1
gi|160899469|ref|YP_001565051.1
gi|120611683|ref|YP_971361.1
gi|71066667|ref|YP_265394.1
gi|93007258|ref|YP_581695.1
gi|134094953|ref|YP_001100028.1
gi|209904237|ref|ZP_03278741.1
gi|198256435|gb|EDY80743.1
gi|114705373|ref|ZP_01438281.1
gi|186454892|ref|ZP_02965207.1
110
120
PANYGFRYNEAF
PSNYGAAYNKQF
PPNYGATYTEQF
PPNYGADYNQRF
PPNYGAAYADRF
PPNYGANYTRQF
PPNYGAGYRQRL
PPNYGAAYTDAF
PPNYGARYTSAF
PPNMGAEYATEF
PPLIGATYAREF
PTNYGARYNRMF
PPNYGGAYGAGF
PPNYGGRYAEAF
PPLLSGAWASAF
PTNYGGRYAKAF
PPNFGSRYTTLF
PPNFGSRYTQPF
PPNYGSAYAATF
PPNYGSGYTRQF
PPNYGSDYTRRF
YDNLGSDYVKSF
YDNLGSDYVKSF
PPNYGSDYTKQF
PPNYGNHFTERF
PPNLGEDYTKEF
PPNMGEDYAERF
PPNMGEEYNKAY
Y117
Y117L, Y117W
E.coli_TesA_1U8U
gi|69935214|ref|ZP_00630194.1
gi|197103612|ref|YP_002128989.1
110
120
PANYGRRYNEAFSA
PDHDDP-LRRDWAG
PPLLSGAWASAFDE

FIGURA 50N

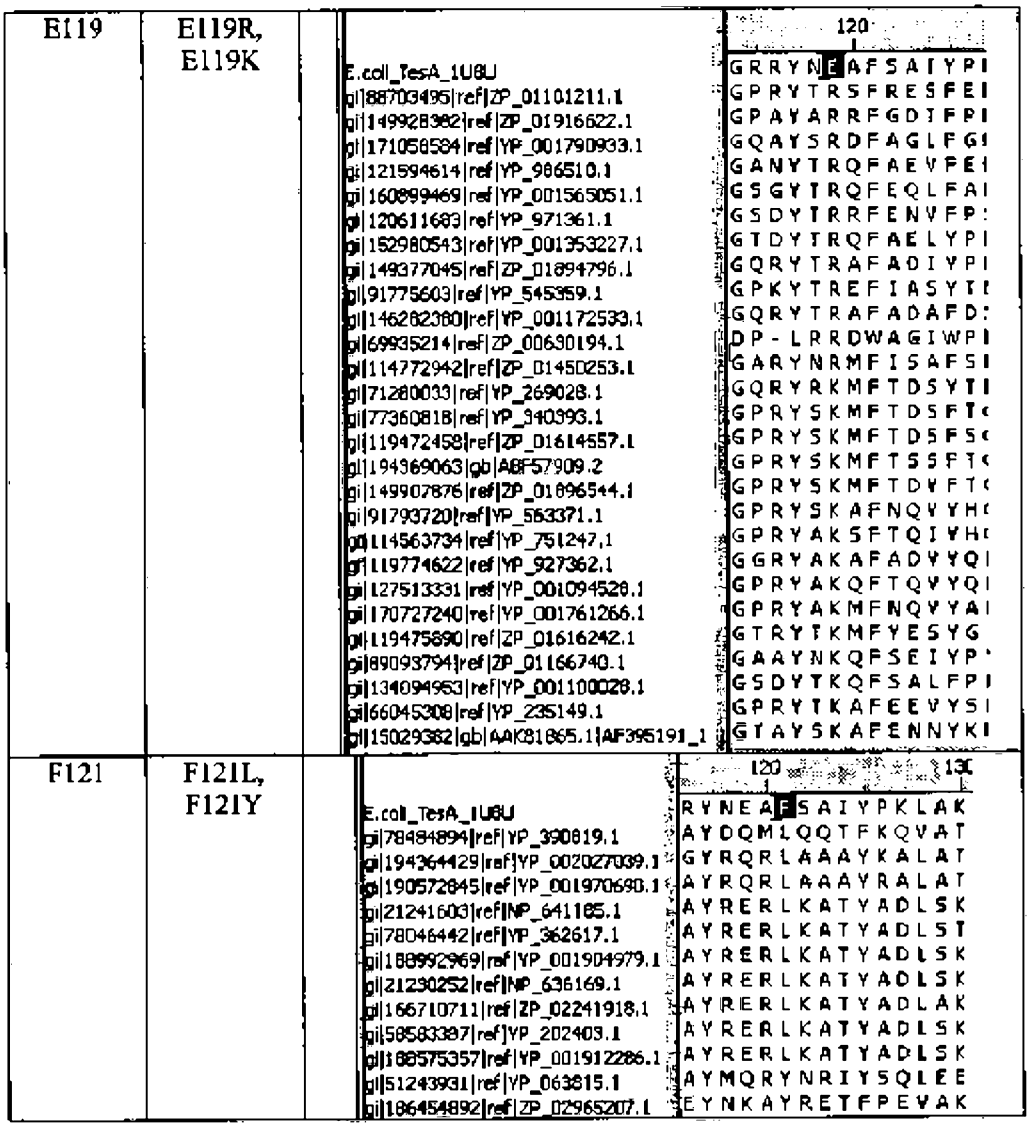

E119
E119R, E119K
F121
F121L, F121Y
E.coli_TesA_1U8U
gi|88703495|ref|ZP_01101211.1
gi|149928382|ref|ZP_01916622.1
gi|171058584|ref|YP_001790933.1
gi|121594614|ref|YP_986510.1
gi|160899469|ref|YP_001565051.1
gi|120611683|ref|YP_971361.1
gi|152980543|ref|YP_001353227.1
gi|149377045|ref|ZP_01894796.1
gi|91775603|ref|YP_545359.1
gi|146282380|ref|YP_001172533.1
gi|69935214|ref|ZP_00630194.1
gi|114772942|ref|ZP_01450253.1
gi|71280033|ref|YP_269028.1
gi|77360818|ref|YP_340393.1
gi|119472458|ref|ZP_01614557.1
gi|194369063|gb|ABF57909.2
gi|149907876|ref|ZP_01896544.1
gi|91793720|ref|YP_563371.1
gi|114563734|ref|YP_751247.1
gi|119774622|ref|YP_927362.1
gi|127513331|ref|YP_001094528.1
gi|170727240|ref|YP_001761266.1
gi|119475890|ref|ZP_01616242.1
gi|89093794|ref|ZP_01166740.1
gi|134094953|ref|YP_001100028.1
gi|66045308|ref|YP_235149.1
gi|15029382|gb|AAK81865.1|AF395191_1
120
GRRYNEAFSAIYPI
GPRYTRSFRESFEI
GPAYARRFGDIFPI
GQAYSRDFAGLFGI
GANYTRQFAEVFEI
GSGYTRQFEQLFAI
GSDYTRRFENVFP:
GTDYTRQFAELYPI
GQRYTRAFADIYPI
GPKYTREFIASYTI
GQRYTRAFADAFD:
DP-LRRDWAGIWPI
GARYNRMFISAFSI
GQRYRKMFTDSYTI
GPRYSKMFTDSFTI
GPRYSKMFTDSFSI
GPRYSKMFTSSFTI
GPRYSKMFTDVFTI
GPRYSKAFNQVYHI
GPRYAKSFTQIYHI
GGRYAKAFADVYQI
GPRYAKQFTQVYQI
GPRYAKMFNQVYAI
GTRYTKMFYESYG
GAAYNKQFSEIYP
GSDYTKQFSALFPI
GPRYTKAFEEVYSI
GTAYSKAFENNYKI
E.coli_TesA_1U8U
gi|78484894|ref|YP_390819.1
gi|194364429|ref|YP_002027039.1
gi|190572845|ref|YP_001970690.1
gi|21241603|ref|NP_641185.1
gi|78046442|ref|YP_362617.1
gi|188992969|ref|YP_001904979.1
gi|21230252|ref|NP_636169.1
gi|166710711|ref|ZP_02241918.1
gi|58583387|ref|YP_202403.1
gi|188575357|ref|YP_001912286.1
gi|51243931|ref|YP_063815.1
gi|186454892|ref|ZP_02965207.1
120
RYNEAFSAIYPKLAK
AYDQMLQQTFKQVAT
GYRQRLAAAYKALAT
AYRQRLAAAYRALAT
AYRERLKATYADLSK
AYRERLKATYADLST
AYRERLKATYADLSK
AYRERLKATYADLSK
AYRERLKATYADLAK
AYRERLKATYADLSK
AYRERLKATYADLSK
AYMQRYNRIYSQLEE
EYNKAYRETFPEVAK

FIGURA 500

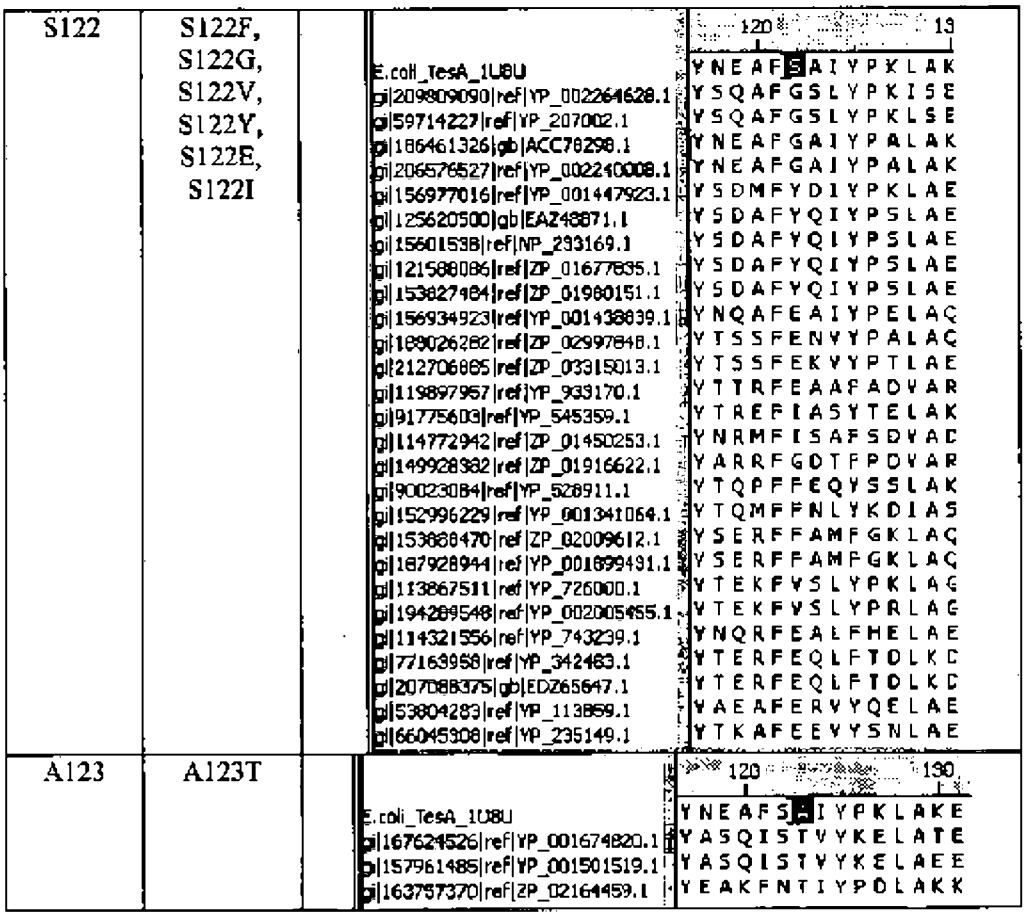

S122
S122F, S122G, S122V, S122Y, S122E, S122I
A123
A123T
E.coli_TesA_1U8U
gi|209809090|ref|YP_002264628.1
gi|59714227|ref|YP_207002.1
gi|186461326|gb|ACC78298.1
gi|206576527|ref|YP_002240008.1
gi|156977016|ref|YP_001447923.1
gi|125620500|gb|EAZ48871.1
gi|15601538|ref|NP_233169.1
gi|121588086|ref|ZP_01677835.1
gi|153827484|ref|ZP_01980151.1
gi|156934923|ref|YP_001438839.1
gi|189026282|ref|ZP_02997848.1
gi|212706885|ref|ZP_03315013.1
gi|119897957|ref|YP_933170.1
gi|91775603|ref|YP_545359.1
gi|114772942|ref|ZP_01450253.1
gi|149928382|ref|ZP_01916622.1
gi|90023084|ref|YP_528911.1
gi|152996229|ref|YP_001341064.1
gi|153868470|ref|ZP_02009612.1
gi|187928944|ref|YP_001899431.1
gi|113867511|ref|YP_726000.1
gi|194289548|ref|YP_002005455.1
gi|114321556|ref|YP_743239.1
gi|77163958|ref|YP_342483.1
gi|207088375|gb|EDZ65647.1
gi|53804283|ref|YP_113859.1
gi|66045308|ref|YP_235149.1
gi|167624526|ref|YP_001674820.1
gi|157961485|ref|YP_001501519.1
gi|163757370|ref|ZP_02164459.1

FIGURA 50P

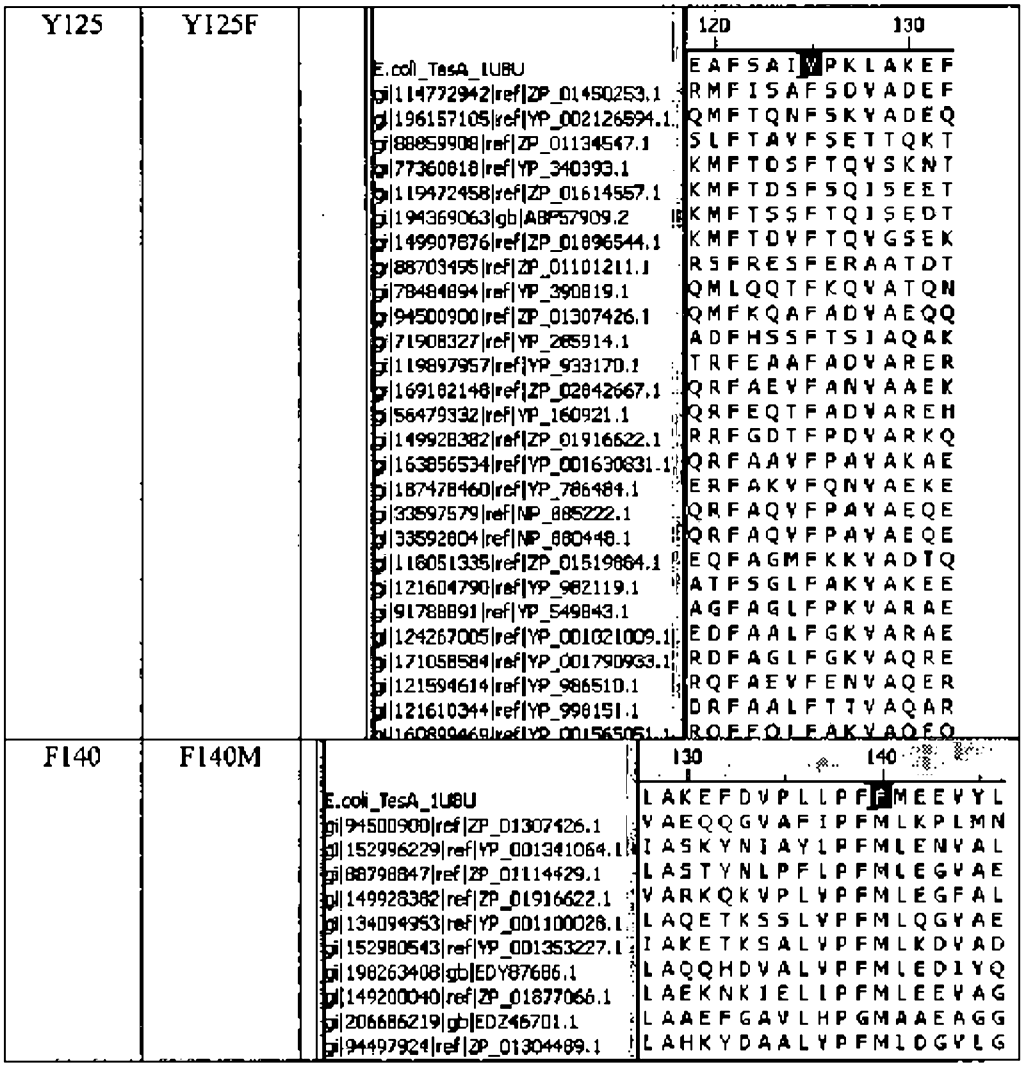

Y125
Y125F
F140
F140M
120
130
140
E.coli_TesA_1U8U
gi|114772942|ref|ZP_01450253.1
gi|196157105|ref|YP_002126594.1
gi|88859908|ref|ZP_01134547.1
gi|77360618|ref|YP_340393.1
gi|119472458|ref|ZP_01614557.1
gi|194369063|gb|ABF57909.2
gi|149907876|ref|ZP_01896544.1
gi|88703495|ref|ZP_01101211.1
gi|78484894|ref|YP_390819.1
gi|94500900|ref|ZP_01307426.1
gi|71908327|ref|YP_285914.1
gi|119897957|ref|YP_933170.1
gi|169102148|ref|ZP_02842667.1
gi|56479332|ref|YP_160921.1
gi|149928382|ref|ZP_01916622.1
gi|163856534|ref|YP_001630831.1
gi|187478460|ref|YP_786484.1
gi|33597579|ref|NP_885222.1
gi|33592804|ref|NP_880448.1
gi|116051335|ref|ZP_01519884.1
gi|121604790|ref|YP_982119.1
gi|91788891|ref|YP_549843.1
gi|124267005|ref|YP_001021009.1
gi|171058584|ref|YP_001790933.1
gi|121594614|ref|YP_986510.1
gi|121610344|ref|YP_998151.1
gi|152996229|ref|YP_001341064.1
gi|88798847|ref|ZP_01114429.1
gi|134094953|ref|YP_001100026.1
gi|152980543|ref|YP_001353227.1
gi|198263408|gb|EDY87686.1
gi|149200040|ref|ZP_01877066.1
gi|206686219|gb|EDZ46701.1
gi|94497924|ref|ZP_01304489.1

FIGURA 50Q

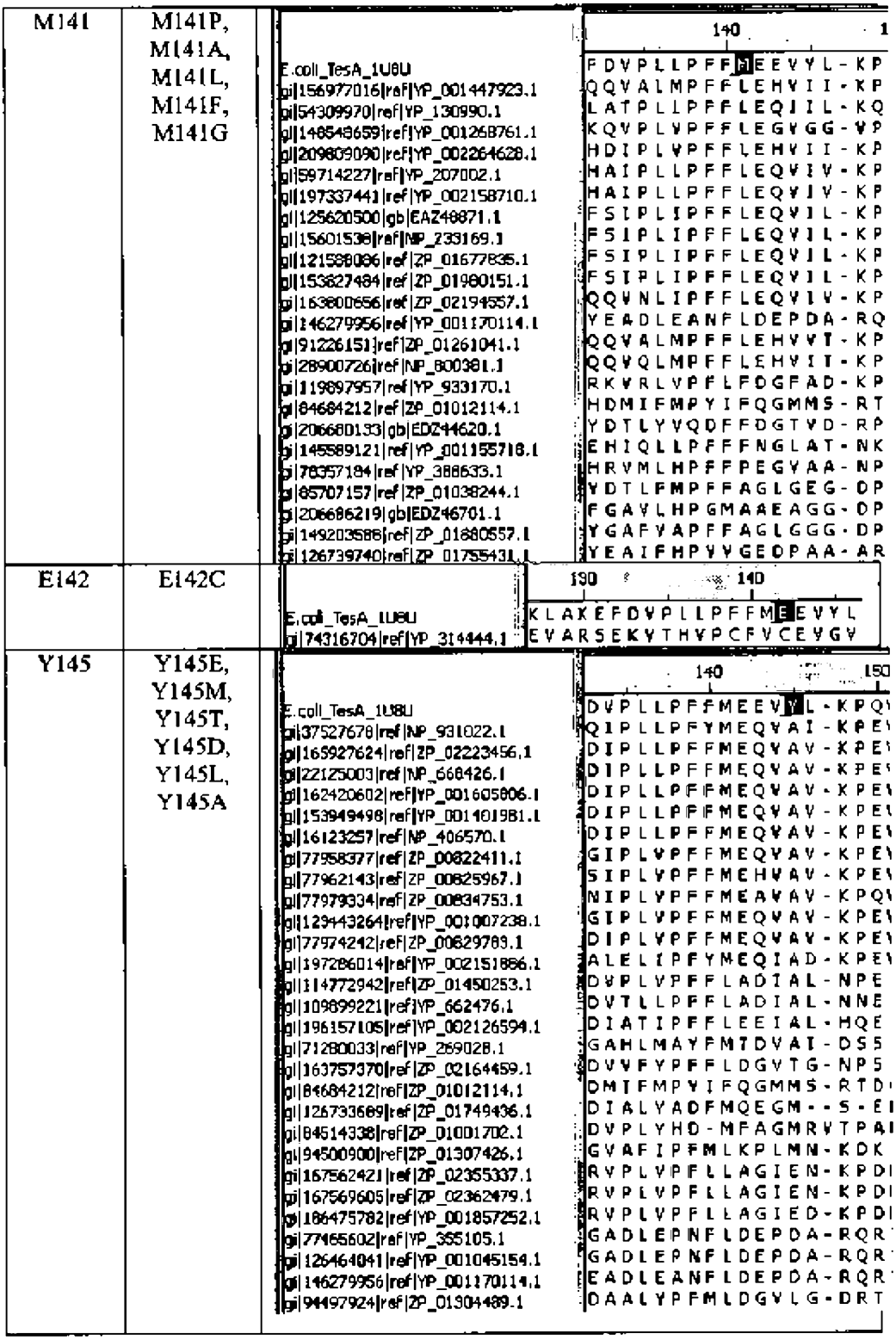

M141
M141P, M141A, M141L, M141F, M141G
E142
E142C
Y145
Y145E, Y145M, Y145T, Y145D, Y145L, Y145A
E.coli_TesA_1U8U
gi|156977016|ref|YP_001447923.1
gi|54309970|ref|YP_130990.1
gi|148548659|ref|YP_001268761.1
gi|209809090|ref|YP_002264628.1
gi|59714227|ref|YP_207002.1
gi|197337441|ref|YP_002158710.1
gi|125620500|gb|EAZ48871.1
gi|15601536|ref|NP_233169.1
gi|121588096|ref|ZP_01677835.1
gi|153827484|ref|ZP_01980151.1
gi|163800656|ref|ZP_02194557.1
gi|146279956|ref|YP_001170114.1
gi|91226151|ref|ZP_01261041.1
gi|28900726|ref|NP_800381.1
gi|119897957|ref|YP_933170.1
gi|84684212|ref|ZP_01012114.1
gi|206680133|gb|EDZ44620.1
gi|145589121|ref|YP_001155718.1
gi|78357184|ref|YP_388633.1
gi|85707157|ref|ZP_01038244.1
gi|206686219|gb|EDZ46701.1
gi|149203586|ref|ZP_01680557.1
gi|126739740|ref|ZP_01755431.1
gi|74316704|ref|YP_314444.1
gi|37527678|ref|NP_931022.1
gi|165927624|ref|ZP_02223456.1
gi|22125003|ref|NP_668426.1
gi|162420602|ref|YP_001605806.1
gi|153949498|ref|YP_001401981.1
gi|16123257|ref|NP_406570.1
gi|77958377|ref|ZP_00822411.1
gi|77962143|ref|ZP_00825967.1
gi|77979334|ref|ZP_00834753.1
gi|123443264|ref|YP_001007238.1
gi|77974242|ref|ZP_00829783.1
gi|197286014|ref|YP_002151886.1
gi|114772942|ref|ZP_01450253.1
gi|109899221|ref|YP_662476.1
gi|196157105|ref|YP_002126594.1
gi|71280033|ref|YP_269028.1
gi|163757370|ref|ZP_02164459.1
gi|84684212|ref|ZP_01012114.1
gi|126733669|ref|ZP_01749436.1
gi|84514338|ref|ZP_01001702.1
gi|94500900|ref|ZP_01307426.1
gi|167562421|ref|ZP_02355337.1
gi|167569605|ref|ZP_02362479.1
gi|186475782|ref|YP_001857252.1
gi|77165602|ref|YP_355105.1
gi|126464041|ref|YP_001045154.1
gi|146279956|ref|YP_001170114.1
gi|94497924|ref|ZP_01304489.1
140
150

FIGURA 50R

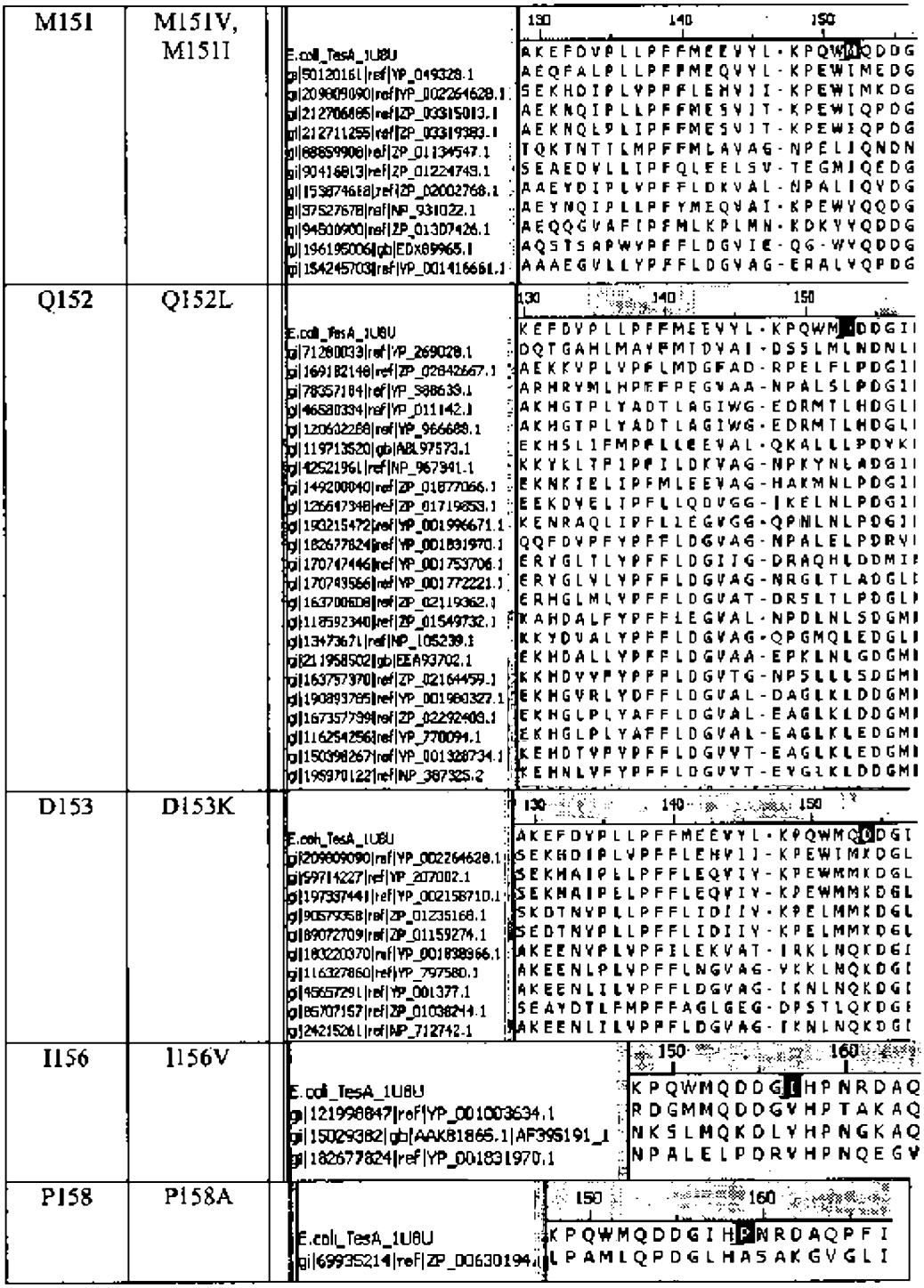

M151
M151V, M151I
Q152
Q152L
D153
D153K
I156
I156V
P158
P158A

FIGURA 50S

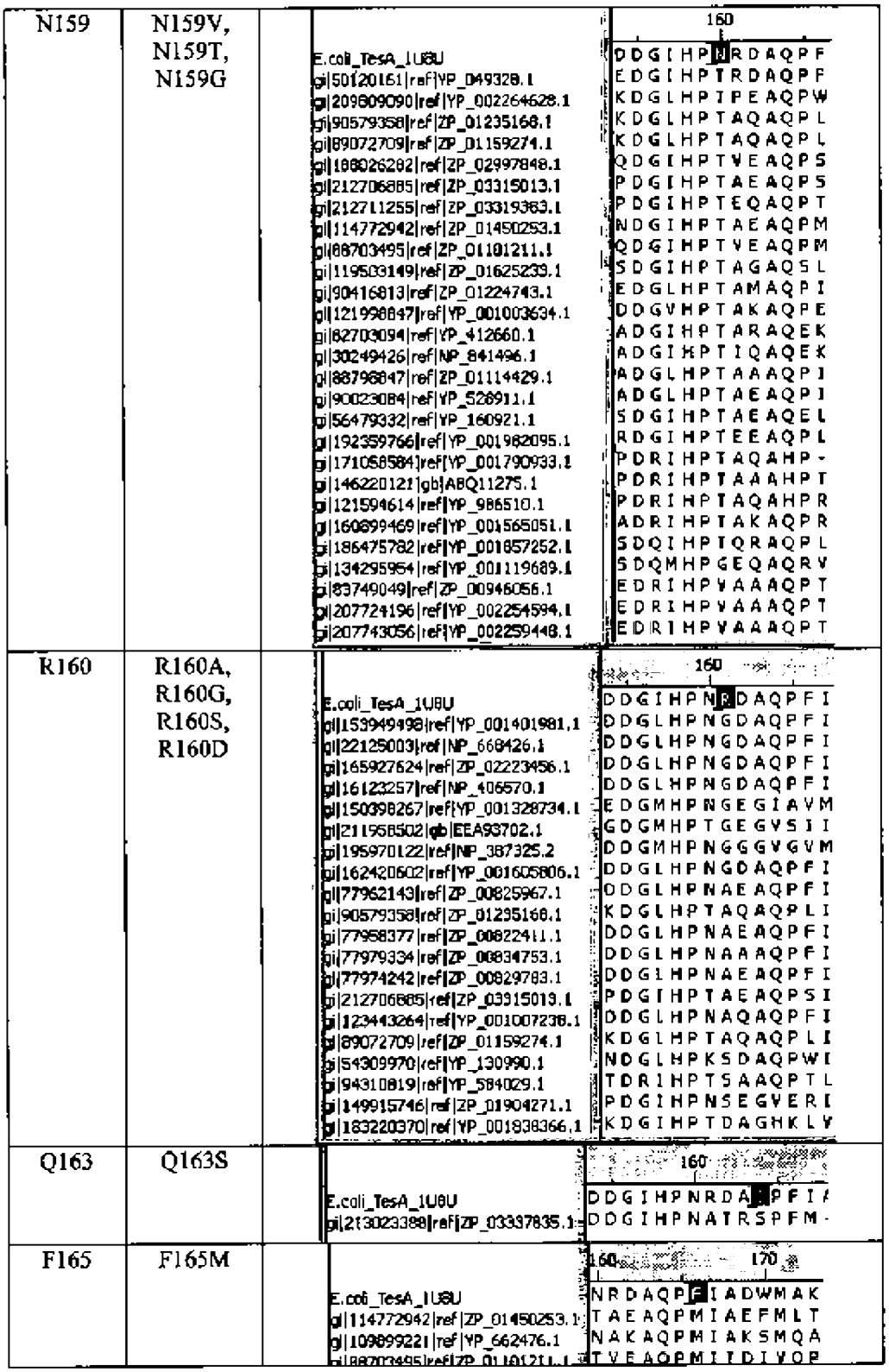

N159
N159V, N159T, N159G
R160
R160A, R160G, R160S, R160D
Q163
Q163S
F165
F165M
160
170

FIGURA 50T

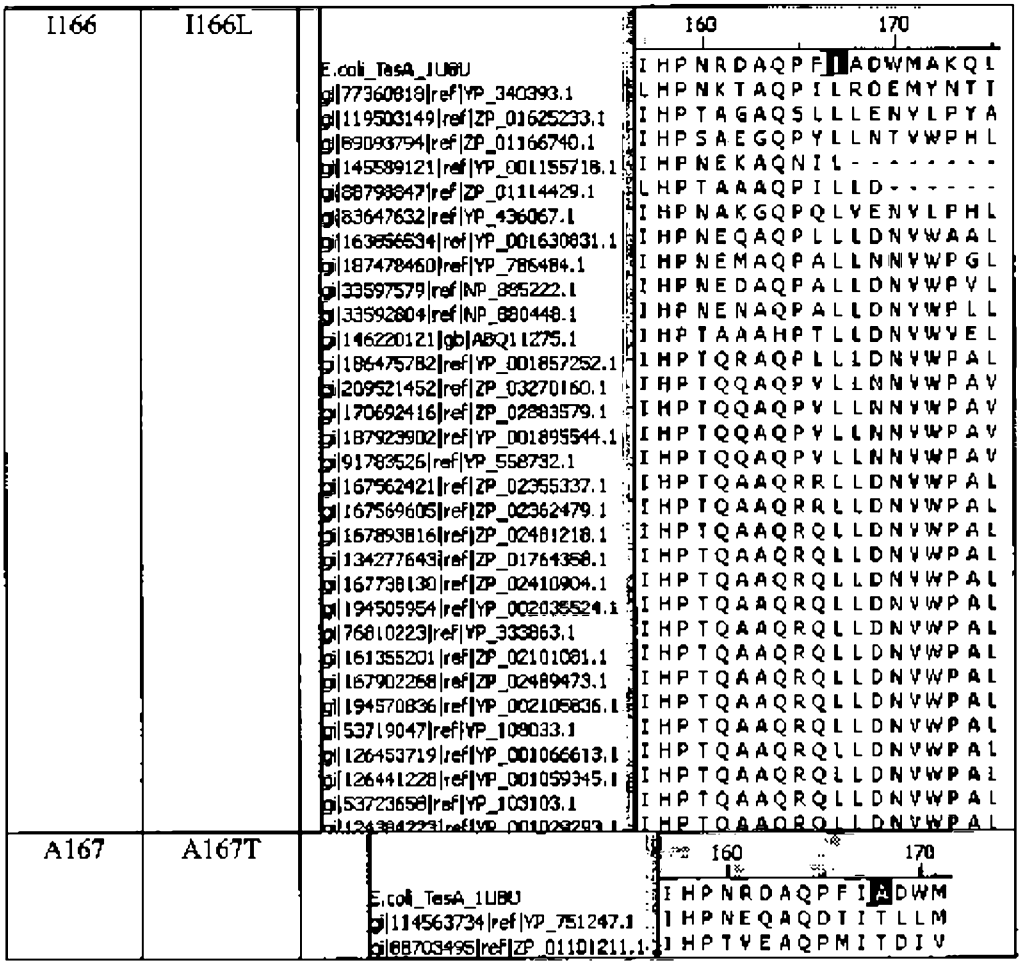

I166
I166L
160
170
E.coli_TesA_1U8U
gi|77360818|ref|YP_340393.1
gi|119503149|ref|ZP_01625233.1
gi|89093794|ref|ZP_01166740.1
gi|145589121|ref|YP_001155718.1
gi|88793847|ref|ZP_01114429.1
gi|83647632|ref|YP_436067.1
gi|163856534|ref|YP_001630831.1
gi|187478460|ref|YP_786484.1
gi|33597579|ref|NP_885222.1
gi|33592804|ref|NP_880448.1
gi|146220121|gb|ABQ11275.1
gi|186475782|ref|YP_001857252.1
gi|209521452|ref|ZP_03270160.1
gi|170692416|ref|ZP_02883579.1
gi|187923902|ref|YP_001895544.1
gi|91783526|ref|YP_558732.1
gi|167562421|ref|ZP_02355337.1
gi|167569605|ref|ZP_02362479.1
gi|167893816|ref|ZP_02481218.1
gi|134277643|ref|ZP_01764358.1
gi|167738130|ref|ZP_02410904.1
gi|194505954|ref|YP_002035524.1
gi|76810223|ref|YP_333863.1
gi|161355201|ref|ZP_02101081.1
gi|167902268|ref|ZP_02489473.1
gi|194570836|ref|YP_002105636.1
gi|53719047|ref|YP_109033.1
gi|126453719|ref|YP_001066613.1
gi|126441228|ref|YP_001059345.1
gi|53723658|ref|YP_103103.1
A167
A167T
E.coli_TesA_1U8U
gi|114563734|ref|YP_751247.1
gi|68703495|ref|ZP_01101211.1

FIGURA 51A

dbj|AP007255.1
dbj|AP008229.1
dbj|AP008232.1
dbj|AP009384.1
dbj|BA000007.2
dbj|BA000032.2
dbj|BA000038.2
dbj|BAAW01000080.1
dbj|BAAW01003851.1
dbj|BAAW01008327.1
dbj|BAAW01012499.1
dbj|BAAW01015319.1
dbj|BAAX01023606.1
emb|AJ537556.1|UNK537556
emb|AL499619.1|LMFLCHR16
emb|AL499622.1|LMFLCHR32
emb|AL590842.1
emb|AL627267.1
emb|AL646052.1
emb|AL954747.1
emb|AM039952.1
emb|AM167904.1
emb|AM260479.1
emb|AM286415.1
emb|AM286690.1
emb|AM406670.1
emb|AM902716.1
emb|BX571871.1
emb|BX571965.1
emb|BX572593.1
emb|BX640416.1
emb|BX640432.1
emb|BX640446.1
emb|BX936398.1
emb|BX950851.1
emb|CAD61204.1
emb|CR378672.1
emb|CR543861.1
emb|CR954246.1
emb|CT573326.1
emb|CU207211.1
emb|CU234118.1
emb|X71116.1|VMP1662
gb|AAAA02045720.1
gb|AACV01025855.1
gb|AACV01026072.1
gb|AACV01029939.1
gb|AACY020000130.1
gb|AACY020014506.1
gb|AACY020022286.1
gb|AACY020022355.1
gb|AACY020039259.1
gb|AACY020045251.1
gb|AACY020046419.1
gb|AACY020047385.1
gb|AACY020055714.1
gb|AACY020063599.1
gb|AACY020074167.1
gb|AACY020074366.1
gb|AACY020093792.1
gb|AACY020108764.1
gb|AACY020111063.1
gb|AACY020111064.1
gb|AACY020134856.1
gb|AACY020145333.1
gb|AACY020145771.1
gb|AACY020184726.1
gb|AACY020237026.1
gb|AACY020242275.1
gb|AACY020259651.1
gb|AACY020262079.1
gb|AACY020281768.1
gb|AACY020291995.1
gb|AACY020301750.1
gb|AACY020307221.1
gb|AACY020329402.1
gb|AACY020351844.1
gb|AACY020355833.1
gb|AACY020365173.1
gb|AACY020368816.1
gb|AACY020373791.1
gb|AACY020376764.1
gb|AACY020385476.1
gb|AACY020397913.1
gb|AACY020399540.1
gb|AACY020412418.1
gb|AACY020413074.1
gb|AACY020413415.1
gb|AACY020421995.1
gb|AACY020440166.1
gb|AACY020442826.1
gb|AACY020448939.1
gb|AACY020462670.1
gb|AACY020484856.1
gb|AACY020500357.1
gb|AACY020501970.1
gb|AACY020503987.1
gb|AACY020508107.1
gb|AACY020520332.1
gb|AACY020525877.1
gb|AACY020527033.1
gb|AACY020528033.1
gb|AACY020529987.1
gb|AACY020536168.1
gb|AACY020538235.1
gb|AACY020539054.1
gb|AACY020548368.1
gb|AACY020551059.1
gb|AACY020557224.1
gb|AACY020559781.1
gb|AACY020561170.1
gb|AACY020561311.1
gb|AACY020577147.1
gb|AACY020597815.1
gb|AACY020603183.1
gb|AACY020608825.1
gb|AACY020629299.1
gb|AACY020714154.1
gb|AACY020727996.1
gb|AACY020759226.1
gb|AACY020784436.1
gb|AACY020834760.1
gb|AACY020839834.1
gb|AACY020868630.1
gb|AACY020917183.1
gb|AACY020958566.1
gb|AACY020990569.1
gb|AACY021019213.1
gb|AACY021020329.1
gb|AACY021023140.1
gb|AACY021026108.1
gb|AACY021059895.1
gb|AACY021060006.1
gb|AACY021070713.1
gb|AACY021076206.1
gb|AACY021115796.1
gb|AACY021166167.1
gb|AACY021245686.1
gb|AACY021260329.1
gb|AACY021268388.1
gb|AACY021275321.1
gb|AACY021288062.1
gb|AACY021314456.1
gb|AACY021334178.1
gb|AACY021344027.1
gb|AACY021383177.1
gb|AACY021451602.1
gb|AACY021583045.1
gb|AACY021586453.1
gb|AACY021608834.1
gb|AACY021641112.1
gb|AACY021691881.1
gb|AACY021705793.1
gb|AACY021712936.1
gb|AACY021721493.1
gb|AACY021739391.1
gb|AACY021784434.1
gb|AACY021819907.1
gb|AACY021848317.1
gb|AACY021853587.1
gb|AACY021891459.1
gb|AACY021899606.1
gb|AACY021919551.1
gb|AACY021938954.1
gb|AACY021947911.1
gb|AACY021963896.1
gb|AACY021984021.1
gb|AACY022040971.1
gb|AACY022045015.1
gb|AACY022065493.1
gb|AACY022078953.1
gb|AACY022105658.1
gb|AACY022129745.1
gb|AACY022140162.1
gb|AACY022151412.1
gb|AACY022158644.1
gb|AACY022178276.1

FIGURA 51B

gb|AACY022209206.1
gb|AACY022212959.1
gb|AACY022218518.1
gb|AACY022219522.1
gb|AACY022231109.1
gb|AACY022242656.1
gb|AACY022277008.1
gb|AACY022282671.1
gb|AACY022329894.1
gb|AACY022348615.1
gb|AACY022377715.1
gb|AACY022380265.1
gb|AACY022465251.1
gb|AACY022510303.1
gb|AACY022575717.1
gb|AACY022607847.1
gb|AACY022636395.1
gb|AACY022672162.1
gb|AACY022685318.1
gb|AACY022706774.1
gb|AACY022710910.1
gb|AACY022761432.1
gb|AACY022779517.1
gb|AACY022786809.1
gb|AACY022792439.1
gb|AACY022794397.1
gb|AACY022850370.1
gb|AACY022879954.1
gb|AACY022895438.1
gb|AACY022931408.1
gb|AACY022939397.1
gb|AACY022975187.1
gb|AACY023000354.1
gb|AACY023011187.1
gb|AACY023028940.1
gb|AACY023036979.1
gb|AACY023064011.1
gb|AACY023073442.1
gb|AACY023081853.1
gb|AACY023088523.1
gb|AACY023101395.1
gb|AACY023108227.1
gb|AACY023127322.1
gb|AACY023150083.1
gb|AACY023151385.1
gb|AACY023214217.1
gb|AACY023220721.1
gb|AACY023225833.1
gb|AACY023293937.1
gb|AACY023309868.1
gb|AACY023317959.1
gb AACY023341349.1
gb|AACY023344504.1
gb|AACY023397471.1
gb|AACY023419945.1
gb|AACY023423908.1
gb|AACY023459087.1
gb|AACY023466994.1
gb|AACY023470806.1
gb|AACY023471792.1

gb|AACY023472351.1
gb|AACY023474031.1
gb|AACY023483626.1
gb|AACY023512718.1
gb|AACY023518449.1
gb|AACY023573915.1
gb|AACY023574575.1
gb|AACY023575256.1
gb|AACY023580795.1
gb|AACY023597741.1
gb|AACY023600467.1
gb|AACY023629708.1
gb|AACY023630954.1
gb|AACY023638464.1
gb|AACY023647630.1
gb|AACY023649900.1
gb|AACY023659331.1
gb|AACY023667824.1
gb|AACY023676429.1
gb|AACY023685825.1
gb|AACY023793978.1
gb|AACY023794579.1
gb|AACY023802343.1
gb|AACY023803322.1
gb|AACY023804625.1
gb|AACY023810273.1
gb|AACY023812347.1
gb|AACY023824210.1
gb|AACY023824449.1
gb|AACY023825258.1
gb|AACY023825339.1
gb|AACY023828022.1
gb|AACY023831940.1
gb|AACY023837606.1
gb|AACY023837743.1
gb|AACY023841556.1
gb|AACY023874455.1
gb|AACY023876717.1
gb|AACY023882676.1
gb|AACY023908767.1
gb|AACY023929341.1
gb|AACY023947565.1
gb|AACY023964925.1
gb|AACY023970962.1
gb|AACY023972056.1
gb|AACY023974977.1
gb|AACY023980237.1
gb|AACY023984499.1
gb|AACY024025458.1
gb|AACY024034457.1
gb|AACY024063931.1
gb|AACY024085821.1
gb|AACY024096204.1
gb|AACY024096594.1
gb|AAFX01005675.1
gb|AAFX01011167.1
gb|AAFX01025782.1
gb|AAFX01038468.1
gb|AAFX01066401.1
gb|AAFX01106490.1

gb|AAFX01116872.1
gb|AAHY01746239.1
gb|AAK16084.1|AF288082_2
gb|AAK81865.1|AF395191_1
gb|AAMB02000002.1
gb|AAQ28697.1
gb|AAR43890.1
gb|AAR53009.1
gb|AASG02022698.1
gb|AASG02023246.1
gb|AASZ01000785.1
gb|AAT50732.1
gb|AATN01000167.1
gb|AATN01000814.1
gb|AATN01001106.1
gb|AATO01000008.1
gb|AATO01001850.1
gb|AATO01003739.1
gb|AATO01010104.1
gb|AAVS01000036.1
gb|AAVT01000002.1
gb|AAVV01000002.1
gb|AAX37297.1
gb|ABDH01009660.1
gb|ABDH01051283.1
gb|ABEF01005448.1
gb|ABEF01038687.1
gb|ABEF01040384.1
gb|ABEF01048738.1
gb|ABEF01052460.1
gb|ABF57909.2
gb|ABH77568.1
gb|ABQ11417.2
gb|ABOK01442679.1
gb|ABOK01586584.1
gb|ABQ11275.1
gb|ABZ56880.1
gb|ACC78298.1
gb|AE003853.1
gb|AE004091.2
gb|AE005174.2
gb|AE005673.1
gb|AE005674.1
gb|AE008719.1
gb|AE009952.1
gb|AE011715.1
gb|AE012177.1
gb|AE013598.1
gb|AE014073.1
gb|AE014299.1
gb|AE014613.1
gb|AE015451.1
gb|AE016796.1
gb|AE016825.1
gb|AE016853.1
gb|AE017042.1
gb|AE017220.1
gb|AE017282.2
gb|AE017340.1
gb|AF288082.1|AF288082

FIGURA 51C

gb|AF395190.2
gb|AY658457.1
gb|AY833091.1
gb|BZ549080.1
gb|CD439532.1
gb|CF322583.1
gb|CL669240.1
gb|CO742357.1
gb|CP000010.1
gb|CP000026.1
gb|CP000034.1
gb|CP000036.1
gb|CP000050.1
gb|CP000058.1
gb|CP000075.1
gb|CP000076.1
gb|CP000086.1
gb|CP000089.1
gb|CP000090.1
gb|CP000094.1
gb|CP000103.1
gb|CP000109.2
gb|CP000112.1
gb|CP000115.1
gb|CP000116.1
gb|CP000124.1
gb|CP000127.1
gb|CP000151.1
gb|CP000155.1
gb|CP000250.1
gb|CP000266.1
gb|CP000267.1
gb|CP000269.1
gb|CP000282.1
gb|CP000283.1
gb|CP000284.1
gb|CP000285.1
gb|CP000301.1
gb|CP000302.1
gb|CP000304.1
gb|CP000305.1
gb|CP000308.1
gb|CP000316.1
gb|CP000319.1
gb|CP000352.1
gb|CP000380.1
gb|CP000388.1
gb|CP000438.1
gb|CP000440.1
gb|CP000444.1
gb|CP000446.1
gb|CP000447.1
gb|CP000450.1
gb|CP000453.1
gb|CP000458.1
gb|CP000462.1
gb|CP000463.1
gb|CP000469.1
gb|CP000494.1
gb|CP000503.1
gb|CP000507.1
gb|CP000510.1
gb|CP000512.1
gb|CP000514.1
gb|CP000521.1
gb|CP000526.1
gb|CP000529.1
gb|CP000539.1
gb|CP000544.1
gb|CP000546.1
gb|CP000548.1
gb|CP000555.1
gb|CP000563.1
gb|CP000570.1
gb|CP000572.1
gb|CP000606.1
gb|CP000614.1
gb|CP000626.1
gb|CP000644.1
gb|CP000647.1
gb|CP000653.1
gb|CP000655.1
gb|CP000668.1
gb|CP000680.1
gb|CP000681.1
gb|CP000712.1
gb|CP000720.1
gb|CP000744.1
gb|CP000749.1
gb|CP000753.1
gb|CP000783.1
gb|CP000790.1
gb|CP000821.1
gb|CP000822.1
gb|CP000826.1
gb|CP000851.1
gb|CP000868.1
gb|CP000880.1
gb|CP000884.1
gb|CP000886.1
gb|CP000891.1
gb|CP000901.1
gb|CP000908.1
gb|CZ545523.1
gb|DQ771288.1
gb|DQ775969.1
gb|DU774646.1
gb|DU780221.1
gb|DX074846.1
gb|EAZ48871.1
gb|EBB00196.1
gb|EBB00995.1
gb|EBB14613.1
gb|EBB44352.1
gb|EBB65340.1
gb|EBB86785.1
gb|EBC00015.1
gb|EBC61260.1
gb|EBC67157.1
gb|EBC78525.1
gb|EBC80168.1
gb|EBC89014.1
gb|EBD12471.1
gb|EBD44387.1
gb|EBD83454.1
gb|EBE34945.1
gb|EBE46909.1
gb|EBE51481.1
gb|EBF18406.1
gb|EBF25038.1
gb|EBF35305.1
gb|EBF42247.1
gb|EBF46989.1
gb|EBF47131.1
gb|EBF48585.1
gb|EBF48999.1
gb|EBF70249.1
gb|EBF74014.1
gb|EBF84055.1
gb|EBF86466.1
gb|EBF88229.1
gb|EBG02140.1
gb|EBG03131.1
gb|EBH92870.1
gb|EBI09735.1
gb|EBI25014.1
gb|EBI40029.1
gb|EBI56927.1
gb|EBI60584.1
gb|EBI78401.1
gb|EBJ53471.1
gb|EBJ62451.1
gb|EBJ63565.1
gb|EBJ64666.1
gb|EBK67121.1
gb|EBK79457.1
gb|EBL34868.1
gb|EBL54355.1
gb|EBL57875.1
gb|EBL69503.1
gb|EBL86174.1
gb|EBM55815.1
gb|EBM63919.1
gb|EBN11937.1
gb|EBO21799.1
gb|EBO27566.1
gb|EBO70247.1
gb|EBO84406.1
gb|EBP12605.1
gb|EBQ43581.1
gb|EBQ56471.1
gb|EBR96977.1
gb|EBS05704.1
gb|EBS21319.1
gb|EBS29947.1
gb|EBS52576.1
gb|EBS87208.1
gb|EBS97371.1
gb|EBT20408.1
gb|EBT33808.1

FIGURA 51D

gb|EBT66016.1
gb|EBU12431.1
gb|EBU22544.1
gb|EBU77869.1
gb|EBV49315.1
gb|EBV56371.1
gb|EBV65046.1
gb|EBV84832.1
gb|EBW51301.1
gb|EBX02078.1
gb|EBX43817.1
gb|EBX78437.1
gb|EBY36073.1
gb|EBY78830.1
gb|EBY98532.1
gb|EBZ04862.1
gb|EBZ09819.1
gb|EBZ17831.1
gb|ECA00284.1
gb|ECA11464.1
gb|ECA76985.1
gb|ECB56272.1
gb|ECB74738.1
gb|ECB77773.1
gb|ECC13206.1
gb|ECC26498.1
gb|ECC37977.1
gb|ECC47879.1
gb|ECC73123.1
gb|ECC78215.1
gb|ECC91531.1
gb|ECD18906.1
gb|ECE14473.1
gb|ECE44114.1
gb|ECE67400.1
gb|ECF24361.1
gb|ECF30240.1
gb|ECF37835.1
gb|ECF93596.1
gb|ECF98523.1
gb|ECG10921.1
gb|ECG16969.1
gb|ECG23088.1
gb|ECG38755.1
gb|ECG70380.1
gb|ECH02658.1
gb|ECI03908.1
gb|ECI15831.1
gb|ECJ11841.1
gb|ECJ13936.1
gb|ECJ68205.1
gb|ECK39698.1
gb|ECK49422.1
gb|ECK84801.1
gb|ECL48993.1
gb|ECL92086.1
gb|ECM04375.1
gb|ECM61983.1
gb|ECM77528.1
gb|ECM90949.1
gb|ECM91670.1
gb|ECN07633.1
gb|ECN11725.1
gb|ECN27086.1
gb|ECN63461.1
gb|ECN88937.1
gb|ECO63169.1
gb|ECP23021.1
gb|ECP37860.1
gb|ECP43062.1
gb|ECP53348.1
gb|ECQ61864.1
gb|ECR76976.1
gb|ECS36544.1
gb|ECS77197.1
gb|ECS89566.1
gb|ECS93972.1
gb|ECT11214.1
gb|ECT28045.1
gb|ECU27475.1
gb|ECU27569.1
gb|ECU50903.1
gb|ECV05661.1
gb|ECV09153.1
gb|ECV17481.1
gb|ECV30343.1
gb|ECV59558.1
gb|ECV66424.1
gb|ECV92255.1
gb|ECW21397.1
gb|ECW27586.1
gb|ECW34552.1
gb|ECW51884.1
gb|ECW86476.1
gb|ECX03181.1
gb|ECX07607.1
gb|ECX51959.1
gb|ECY15974.1
gb|ECY51053.1
gb|ECY65264.1
gb|ECY72008.1
gb|ECZ13704.1
gb|ECZ32055.1
gb|ECZ32791.1
gb|ECZ63045.1
gb|ECZ95526.1
gb|EDA15220.1
gb|EDA34659.1
gb|EDA43162.1
gb|EDA65955.1
gb|EDA75330.1
gb|EDB33474.1
gb|EDB63930.1
gb|EDC11631.1
gb|EDC18259.1
gb|EDC79853.1
gb|EDC86032.1
gb|EDE13368.1
gb|EDF12274.1
gb|EDF13440.1
gb|EDG04054.1
gb|EDG10020.1
gb|EDG47637.1
gb|EDG96629.1
gb|EDH45122.1
gb|EDH65891.1
gb|EDH68511.1
gb|EDH71634.1
gb|EDH86342.1
gb|EDI26270.1
gb|EDI26458.1
gb|EDI44671.1
gb|EDI82121.1
gb|EDJ18110.1
gb|EDJ33361.1
gb|EDJ60226.1
gb|EDX89965.1
gb|EDY87686.1
gb|EDZ46701.1
gb|EDZ65647.1
gb|EJ085421.1
gb|EJ099644.1
gb|EJ137266.1
gb|EJ146674.1
gb|EJ191501.1
gb|EJ212903.1
gb|EJ225122.1
gb|EJ227792.1
gb|EJ245549.1
gb|EJ266991.1
gb|EJ278016.1
gb|EJ329588.1
gb|EJ334720.1
gb|EJ391923.1
gb|EJ426203.1
gb|EJ434827.1
gb|EJ471737.1
gb|EJ477947.1
gb|EJ484731.1
gb|EJ498664.1
gb|EJ500550.1
gb|EJ555922.1
gb|EJ564676.1
gb|EJ640224.1
gb|EJ645847.1
gb|EJ650695.1
gb|EJ662911.1
gb|EJ664069.1
gb|EJ665938.1
gb|EJ667820.1
gb|EJ669120.1
gb|EJ703050.1
gb|EJ721950.1
gb|EJ730460.1
gb|EJ770502.1
gb|EJ777637.1
gb|EJ785431.1
gb|EJ788765.1
gb|EJ815775.1
gb|EJB51744.1

FIGURA 51E

gb|EJ873052.1	gb|EK918170.1	ref|NP_636169.1
gb|EJ879757.1	gb|EK935500.1	ref|NP_641185.1
gb|EJ902539.1	gb|EK947561.1	ref|NP_668426.1
gb|EJ931567.1	gb|EK951364.1	ref|NP_712742.1
gb|EJ937131.1	gb|EK960146.1	ref|NP_718498.1
gb|EJ972947.1	gb|EK960826.1	ref|NP_744467.1
gb|EJ990165.1	gb|EK967818.1	ref|NP_762242.1
gb|EJ999222.1	gb|EK981215.1	ref|NP_792087.1
gb|EK000110.1	gb|EK983743.1	ref|NP_800381.1
gb|EK000629.1	gb|EK984099.1	ref|NP_841496.1
gb|EK023293.1	gb|EK989854.1	ref|NP_880448.1
gb|EK065797.1	gb|EK990735.1	ref|NP_885222.1
gb|EK078447.1	gb|EK991845.1	ref|NP_889542.1
gb|EK093951.1	gb|ER010920.1	ref|NP_903405.1
gb|EK109020.1	gb|ER032330.1	ref|NP_931022.1
gb|EK123650.1	gb|ER049290.1	ref|NP_936828.1
gb|EK133187.1	gb|ER052609.1	ref|NP_945548.1
gb|EK180280.1	gb|ER096625.1	ref|NW_001083568.1
gb|EK196880.1	gb|ER127282.1	ref|NZ_AAAU03000001.1
gb|EK222554.1	gb|ER130376.1	ref|NZ_AACX01000017.1
gb|EK257255.1	gb|ER131376.1	ref|NZ_AAGE02033712.1
gb|EK313225.1	gb|ER161971.1	ref|NZ_AAHN02000001.1
gb|EK325827.1	gb|ER162312.1	ref|NZ_AAHQ01000021.1
gb|EK441511.1	gb|ER176379.1	ref|NZ_AAHR02000004.1
gb|EK492959.1	gb|ER177550.1	ref|NZ_AAHS03000025.1
gb|EK507776.1	gb|ER195612.1	ref|NZ_AAHV02000013.1
gb|EK508176.1	gb|ER200449.1	ref|NZ_AAHW02000002.1
gb|EK529306.1	gb|ER206437.1	ref|NZ_AAIQ02000012.1
gb|EK539522.1	gb|ER211547.1	ref|NZ_AAIR02000006.1
gb|EK543851.1	gb|ER212475.1	ref|NZ_AAKH02000182.1
gb|EK576280.1	gb|ER214473.1	ref|NZ_AAKI02000073.1
gb|EK601818.1	gb|ER214855.1	ref|NZ_AAKJ02000066.1
gb|EK616119.1	gb|ER242449.1	ref|NZ_AAKK02000006.1
gb|EK621481.1	gb|ER253849.1	ref|NZ_AAKL01000052.1
gb|EK623494.1	gb|ER262881.1	ref|NZ_AAKV01000034.1
gb|EK628542.1	gb|ER350440.1	ref|NZ_AAKW01000024.1
gb|EK639369.1	gb|ER382137.1	ref|NZ_AAKX01000089.1
gb|EK645136.1	gb|ER390228.1	ref|NZ_AAKY01000063.1
gb|EK666683.1	gb|ER423386.1	ref|NZ_AALC01000018.1
gb|EK670222.1	gb|ER429221.1	ref|NZ_AALD01000017.1
gb|EK670523.1	gb|ER442323.1	ref|NZ_AALE01000009.1
gb|EK673679.1	gb|ER442792.1	ref|NZ_AALF01000005.1
gb|EK682200.1	gb|ER471256.1	ref|NZ_AAMK02000007.1
gb|EK691103.1	gb|ER482389.1	ref|NZ_AAMR01000030.1
gb|EK692669.1	gb|ER509480.1	ref|NZ_AAMX01000013.1
gb|EK725644.1	gb|ER566372.1	ref|NZ_AAMY01000001.1
gb|EK743461.1	gb|ER576118.1	ref|NZ_AAND01000039.1
gb|EK771460.1	gb|ER613314.1	ref|NZ_AANX02000019.1
gb|EK791447.1	gb|ER615495.1	ref|NZ_AAOA01000001.1
gb|EK806766.1	gb|FH365651.1	ref|NZ_AAOE01000009.1
gb|EK818832.1	pdb|1JQO|A	ref|NZ_AAOF01000028.1
gb|EK834533.1	pdb|1JRL|A	ref|NZ_AAOH01000005.1
gb|EK835979.1	ref|NP_233169.1	ref|NZ_AAOJ01000002.1
gb|EK837640.1	ref|NP_251546.1	ref|NZ_AAOU01000004.1
gb|EK843333.1	ref|NP_286243.1	ref|NZ_AAOW01000010.1
gb|EK859367.1	ref|NP_406570.1	ref|NZ_AAPH01000018.1
gb|EK885080.1	ref|NP_420568.1	ref|NZ_AAPI01000005.1
gb|EK889609.1	ref|NP_455101.1	ref|NZ_AAPJ01000011.1
gb|EK890943.1	ref|NP_459501.1	ref|NZ_AAPS01000016.1
gb|EK903712.1	ref|NP_519838.1	ref|NZ_AAQN01000001.1

FIGURA 51F

ref|NZ_AAQW01000001.1	ref|NZ_ABFF01000003.1	ref|YP_001970690.1
ref|NZ_AATR01000024.1	ref|NZ_ABFG01000003.1	ref|YP_001982095.1
ref|NZ_AATY01000043.1	ref|YP_001003634.1	ref|YP_001989229.1
ref|NZ_AAUB01000051.1	ref|YP_001007238.1	ref|YP_002005455.1
ref|NZ_AAUJ01000003.1	ref|YP_001021009.1	ref|YP_002027039.1
ref|NZ_AAUR01000070.1	ref|YP_001029293.1	ref|YP_002035524.1
ref|NZ_AAUS01000048.1	ref|YP_001051045.1	ref|YP_002093983.1
ref|NZ_AAUT01000048.1	ref|YP_001059345.1	ref|YP_002098168.1
ref|NZ_AAUU01000083.1	ref|YP_001066613.1	ref|YP_002105836.1
ref|NZ_AAVS01000036.1	ref|YP_001084019.1	ref|YP_002126594.1
ref|NZ_AAVT01000002.1	ref|YP_001094528.1	ref|YP_002151886.1
ref|NZ_AAVV01000002.1	ref|YP_001100028.1	ref|YP_002158710.1
ref|NZ_AAWD01000202.1	ref|YP_001119689.1	ref|YP_002210388.1
ref|NZ_AAWE01000074.1	ref|YP_001140725.1	ref|YP_002225613.1
ref|NZ_AAWF01000084.1	ref|YP_001155718.1	ref|YP_002231119.1
ref|NZ_AAWG01000076.1	ref|YP_001172533.1	ref|YP_002240008.1
ref|NZ_AAWP01000238.1	ref|YP_001175703.1	ref|YP_002254594.1
ref|NZ_AAWQ01000062.1	ref|YP_001188046.1	ref|YP_002259448.1
ref|NZ_AAWQ01000361.1	ref|YP_001202594.1	ref|YP_002264628.1
ref|NZ_AAWY01000065.1	ref|YP_001236582.1	ref|YP_002299265.1
ref|NZ_AAXY01000012.1	ref|YP_001268761.1	ref|YP_045767.1
ref|NZ_AAYR01000001.1	ref|YP_001334153.1	ref|YP_049328.1
ref|NZ_AAYS01000016.1	ref|YP_001341064.1	ref|YP_103103.1
ref|NZ_AAYT01000001.1	ref|YP_001347669.1	ref|YP_108033.1
ref|NZ_AAYU01000018.1	ref|YP_001353227.1	ref|YP_113859.1
ref|NZ_AAYV01000012.1	ref|YP_001366906.1	ref|YP_130990.1
ref|NZ_AAYX01000001.1	ref|YP_001377.1	ref|YP_156150.1
ref|NZ_AAZP01000003.1	ref|YP_001401981.1	ref|YP_202403.1
ref|NZ_AAZW01000032.1	ref|YP_001438839.1	ref|YP_207002.1
ref|NZ_ABAN01000007.3	ref|YP_001447923.1	ref|YP_215534.1
ref|NZ_ABAO01000003.1	ref|YP_001454190.1	ref|YP_235149.1
ref|NZ_ABAT01000020.1	ref|YP_001473435.1	ref|YP_261370.1
ref|NZ_ABAU01000083.1	ref|YP_001477389.1	ref|YP_274258.1
ref|NZ_ABBD01000590.1	ref|YP_001501519.1	ref|YP_285914.1
ref|NZ_ABBE01000454.1	ref|YP_001526681.1	ref|YP_295598.1
ref|NZ_ABBF01000179.1	ref|YP_001555212.1	ref|YP_314444.1
ref|NZ_ABBG01000111.1	ref|YP_001565051.1	ref|YP_317035.1
ref|NZ_ABBH01000617.1	ref|YP_001571431.1	ref|YP_333863.1
ref|NZ_ABBI01000494.1	ref|YP_001579540.1	ref|YP_340393.1
ref|NZ_ABBJ01000389.1	ref|YP_001605806.1	ref|YP_342483.1
ref|NZ_ABBK01000366.1	ref|YP_001630831.1	ref|YP_349742.1
ref|NZ_ABBL01000369.1	ref|YP_001641436.1	ref|YP_362617.1
ref|NZ_ABBM01000232.1	ref|YP_001668159.1	ref|YP_369458.1
ref|NZ_ABBN01000303.1	ref|YP_001674820.1	ref|YP_386909.1
ref|NZ_ABBO01000334.1	ref|YP_001707661.1	ref|YP_388633.1
ref|NZ_ABBP01000274.1	ref|YP_001714611.1	ref|YP_390819.1
ref|NZ_ABBQ01000228.1	ref|YP_001748633.1	ref|YP_402105.1
ref|NZ_ABBR01000205.1	ref|YP_001761266.1	ref|YP_406934.1
ref|NZ_ABBZ01001487.1	ref|YP_001765225.1	ref|YP_412660.1
ref|NZ_ABCD01000001.1	ref|YP_001790933.1	ref|YP_423690.1
ref|NZ_ABCH01000016.1	ref|YP_001808536.1	ref|YP_436067.1
ref|NZ_ABCP01000022.1	ref|YP_001831970.1	ref|YP_442651.1
ref|NZ_ABCQ01000002.1	ref|YP_001845605.1	ref|YP_483906.1
ref|NZ_ABCT01000025.1	ref|YP_001857252.1	ref|YP_523672.1
ref|NZ_ABDZ01000018.1	ref|YP_001899431.1	ref|YP_528911.1
ref|NZ_ABEI01000007.1	ref|YP_001904979.1	ref|YP_530091.1
ref|NZ_ABEJ01000025.1	ref|YP_001908369.1	ref|YP_545359.1
ref|NZ_ABEL01000001.1	ref|YP_001912286.1	ref|YP_549843.1
ref|NZ_ABEW01000005.1	ref|YP_001927109.1	ref|YP_563371.1
ref|NZ_ABEX01000002.1	ref|YP_001946344.1	ref|YP_567671.1

FIGURA 51G

ref|YP_574666.1
ref|YP_584029.1
ref|YP_607529.1
ref|YP_625997.1
ref|YP_662476.1
ref|YP_693120.1
ref|YP_726000.1
ref|YP_733613.1
ref|YP_737598.1
ref|YP_743239.1
ref|YP_747911.1
ref|YP_751247.1
ref|YP_773797.1
ref|YP_779242.1
ref|YP_786484.1
ref|YP_790318.1
ref|YP_835563.1
ref|YP_857963.1
ref|YP_869177.1
ref|YP_927362.1
ref|YP_933170.1
ref|YP_944260.1
ref|YP_958323.1
ref|YP_963007.1
ref|YP_971361.1
ref|YP_982119.1
ref|YP_986510.1
ref|ZP_00415149.1
ref|ZP_00440774.1
ref|ZP_00822411.1
ref|ZP_00825967.1
ref|ZP_00829783.1
ref|ZP_00834753.1
ref|ZP_00946056.1
ref|ZP_00991723.1
ref|ZP_01043473.1
ref|ZP_01044690.1
ref|ZP_01066638.1
ref|ZP_01101211.1
ref|ZP_01114429.1
ref|ZP_01128881.1
ref|ZP_01134547.1
ref|ZP_01159274.1
ref|ZP_01166740.1
ref|ZP_01220817.1
ref|ZP_01224743.1
ref|ZP_01229011.1
ref|ZP_01235168.1
ref|ZP_01261041.1
ref|ZP_01366323.1
ref|ZP_01450253.1
ref|ZP_01519884.1
ref|ZP_01614557.1
ref|ZP_01616242.1
ref|ZP_01625233.1
ref|ZP_01677835.1
ref|ZP_01707934.1
ref|ZP_01738317.1
ref|ZP_01764358.1
ref|ZP_01814897.1
ref|ZP_01844343.1
ref|ZP_01867911.1
ref|ZP_01894796.1
ref|ZP_01896544.1
ref|ZP_01916622.1
ref|ZP_01980151.1
ref|ZP_01993202.1
ref|ZP_02002768.1
ref|ZP_02009612.1
ref|ZP_02055185.1
ref|ZP_02101081.1
ref|ZP_02156924.1
ref|ZP_02194557.1
ref|ZP_02223456.1
ref|ZP_02241918.1
ref|ZP_02301590.1
ref|ZP_02344720.2
ref|ZP_02355337.1
ref|ZP_02362479.1
ref|ZP_02374459.1
ref|ZP_02379324.1
ref|ZP_02388333.1
ref|ZP_02410904.1
ref|ZP_02463157.1
ref|ZP_02481218.1
ref|ZP_02489473.1
ref|ZP_02683026.2
ref|ZP_02799578.2
ref|ZP_02842667.1
ref|ZP_02883579.1
ref|ZP_02892970.1
ref|ZP_02902430.1
ref|ZP_02911087.1
ref|ZP_02946716.1
ref|ZP_02997848.1
ref|ZP_03026190.1
ref|ZP_03081449.1
ref|ZP_03163359.1
ref|ZP_03221362.1
ref|ZP_03278741.1
ref|ZP_03281441.1
sp|Q07792|ESTE_VIEMI