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

(21) BR 112014014947-0 A2

(22) Data do Depósito: 21/12/2012

(43) Data da Publicação Nacional: 27/10/2020

(54) Título: PRODUÇÃO ACENTUADA DE ISOPRENO COM O USO DE CÉLULAS HOSPEDEIRAS TENDO ATIVIDADE DE ISPA DIMINUIDA

(51) Int. Cl.: C12N 9/10; C12P 5/00.

(30) Prioridade Unionista: 23/12/2011 US 61/580,163; 27/04/2012 US 61/639,855.

(71) Depositante(es): DANISCO US INC.; THE GOODYEAR TIRE & RUBBER COMPANY.

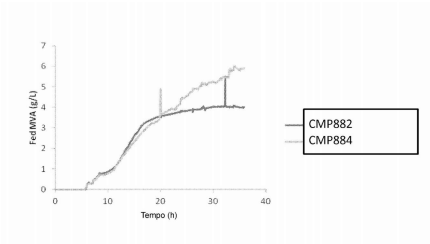
(72) Inventor(es): JOSEPH C. MCAULIFFE; RACHEL E. MUIR; ALEX T. NIELSEN; CAROLINE M. PERES; DMITRII V. VAVILINE; DEREK H. WELLS.

(86) Pedido PCT: PCT US2012071518 de 21/12/2012

(87) Publicação PCT: WO 2013/096925 de 27/06/2013

(85) Data da Fase Nacional: 18/06/2014

(57) Resumo: PRODUÇÃO ACENTUADA DE ISOPRENO COM O USO DE CÉLULAS HOSPEDEIRAS TENDO ATIVIDADE DE ISPA DIMINUÍDA. A presente invenção refere-se a micro-organismos recombinantes capazes de produzir isopreno e à produção de isopreno com o uso de tais micro-organismos recombinantes, com boa eficiência. Nesta invenção, a atividade funcional do gene ispA é alterada para reduzir a produção de moléculas de isoprenoide em células recombinantes manipuladas para produzir isopreno ou em células de outro modo suscetíveis a acúmulo de isoprenoide durante a fermentação. Esta atividade funcional diminuída do gene ispA permite síntese acentuada de isopreno em um micro-organismo hospedeiro.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"PRODUÇÃO ACENTUADA DE ISOPRENO COM O USO DE CÉLULAS HOSPEDEIRAS TENDO ATIVIDADE DE ISPA DIMINUÍDA".**

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS DE DEPÓSITO RELACIONADOS

[001] Este pedido reivindica a prioridade sobre o pedido de patente provisório US n° 61/580.163, depositado em 23 de dezembro de 2011 e o pedido de patente provisório US n° 61/639. 855, depositado em 27 de abril de 2012, cujas descrições estão aqui incorporadas a título de referência em sua totalidade.

INCORPORAÇÃO POR REFERÊNCIA

[002] O conteúdo da seguinte submissão em arquivo de texto ASCII está aqui incorporado, a título de referência em sua totalidade: uma forma legível por computador (CRF) da listagem de sequências (nome do arquivo: 643842004240.txt, data de gravação: 21 de dezembro de 2012, tamanho: 65.536 bytes).

CAMPO DA INVENÇÃO

[003] A presente invenção refere-se geralmente a métodos para produzir isopreno a partir de células cultivadas e composições que incluem estas células cultivadas.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[004] O isopreno (2-metil-1,3-butadieno) é o material de partida crítico para uma variedade de polímeros sintéticos, mais especialmente borrachas sintéticas. O isopreno é produzido naturalmente por uma variedade de espécies microbianas, vegetais e animais. Em particular, foram identificadas duas rotas para a biossíntese do isopreno: a rota do mevalonato (MVA) e a rota de não-mevalonato (DXP). Entretanto, o rendimento do isopreno a partir de organismos de ocorrência natural não é atrativo comercialmente. O isopreno também pode ser obtido mediante o fracionamento do petróleo, a purificação desse material é

dispendiosa e demorada. O craqueamento de petróleo da corrente C5 de hidrocarbonetos produz somente cerca de 15% de isopreno. Cerca de 725.748 toneladas métricas (800.000 toneladas) por ano de cis-poliisopreno são produzidas a partir da polimerização do isopreno; a maior parte deste poli-isopreno é usado na indústria de pneus e borracha. O isopreno também é copolimerizado para uso como um elastômero sintético em outros produtos como calçados, produtos mecânicos, produtos médicos, produtos esportivos, e látex.

[005] Durante o curso do metabolismo em micro-organismos, a rota biossintética dependente de mevalonato converte acetil-CoA em difosfato de isopentenila (IPP) e difosfato de dimetilalila (DMAPP). IPP e DMAPP são precursores do isopreno assim como de uma classe de moléculas de peso molecular mais alto conhecidas como isoprenoides. Os isoprenoides são vitais para a maioria dos organismos vivos e células, fornecendo um meio para manter a fluidez da membrana celular e transporte de elétrons.

[006] Desenvolvimentos recentes na produção de isopreno apresentam métodos para a produção de isopreno a taxas, titulações, e purezas que podem ser suficientes para satisfazer as exigências de processos comerciais robustos (ver, por exemplo, a publicação do pedido internacional de patente n° WO 2009/ 076676 A2; ent retanto, rotas alternativas para aprimorar a produção e os rendimentos do mesmo ainda são necessárias.

[007] São aqui fornecidas células recombinantes cultivadas, composições destas células, e métodos de uso destas células para aumentar a produção de isopreno.

[008] Ao longo deste relatório descritivo, várias patentes, pedidos de patentes e outros tipos de publicações (por exemplo, artigos de revistas) são referenciados. A descrição de todas as patentes, pedidos de patente e publicações aqui citadas está aqui incorporada por refe-

rência na sua totalidade para todos os fins.

BREVE SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[009] A invenção aqui fornecida revela, *entre outros*, composições de substâncias compreendendo células recombinantes e métodos para produzir e usar estas células recombinantes para a produção de isopreno. Em alguns aspectos, os micro-organismos recombinantes compreendem um gene *ispA* que tem atividade funcional diminuída e um ou mais ácidos nucleicos que codificam uma ou mais enzimas isopreno sintase e/ou da rota MVA.

[0010] Consequentemente, em alguns aspectos, são aqui fornecidas células recombinantes capazes de produzir isopreno, sendo que as ditas células compreendem um gene *ispA* tendo atividade funcional diminuída e um ou mais ácidos nucleicos que codificam: (a) um polipeptídeo de isopreno sintase, sendo que o polipeptídeo de isopreno sintase é codificado por um ácido nucleico heterólogo; e (b) um ou mais polipeptídeos da rota do mevalonato (MVA), sendo que a cultura das ditas células recombinantes em um meio adequado proporciona a produção dos ditos polipeptídeos e a síntese de isopreno. Em outros aspectos, a atividade funcional do gene *ispA* é diminuída por: deleção do gene *ispA*; diminuição da expressão gênica de *ispA*; diminuição da atividade de proteína de *ispA*; diminuição da expressão de proteína de *ispA*; ou modulação temporária da expressão de *ispA*. Em outro aspecto, a expressão gênica de *ispA* é diminuída pela colocação do gene *ispA* sob o controle de um promotor fraco. Em alguns aspectos, a expressão gênica de *ispA* é diminuída pela colocação do gene *ispA* sob o controle de um promotor autorregulatório. Em ainda outros aspectos, a atividade de proteína de *ispA*é diminuída pela fusão traducional da proteína *ispA* com uma etiqueta proteolítica. Em outros aspectos, a expressão da proteína *ispA* é diminuída pelo uso de RNA antissenso. Em alguns aspectos, a expressão da proteína *ispA* é diminuída pela

introdução de uma ou mais mutações em um sítio de ligação ribossomal localizado na molécula de mRNA de ispA. Em outros aspectos, a expressão gênica de *ispA* é diminuída por uma proteína repressora transcricional HrcA. Em outro aspecto, a atividade de proteína de *ispA* é diminuída pela substituição do gene endógeno *ispA* por um gene que codifica um polipeptídeo compreendendo um Km aumentado para DMAPP em comparação com o Km do polipeptídeo codificado pelo gene *ispA* endógeno. Em outro aspecto, a atividade de proteína de *ispA* é diminuída pela substituição do gene endógeno *ispA* por um outro gene compreendendo um ótimo de temperatura diferente.

[0011] Em outros aspectos de qualquer uma das células aqui descritas, o polipeptídeo de isopreno sintase é um polipeptídeo de isopreno sintase de plantas ou variante do mesmo. Em alguns aspectos, o polipeptídeo de isopreno sintase é um polipeptídeo de *Pueraria* ou *Populus* ou um híbrido, *Populus alba x Populus tremula* ou variante dos mesmos. Em outro aspecto, o polipeptídeo de isopreno sintase é selecionado do grupo que consiste em *Pueraria montana* ou *Pueraria lobata*, *Populus tremuloides*, *Populus alba* ou variante dos mesmos, *Populus nigra*, e *Populus trichocarpa* ou variante dos mesmos. Em ainda outros aspectos, o polipeptídeo de isopreno sintase de planta é um polipeptídeo de isopreno sintase de kudzu ou uma variante do mesmo. Em ainda outros aspectos, o polipeptídeo de isopreno sintase de planta é um polipeptídeo de isopreno sintase de *Eucalyptus* ou variante do mesmo. Em alguns aspectos de qualquer uma das células aqui descritas, os ditos um ou mais ácidos nucleicos que codificam um ou mais polipeptídeos da rota MVA de (b) é um ácido nucleico heterólogo. Em alguns aspectos, as ditas células compreendem um ou mais ácidos nucleicos que codificam polipeptídeos da via MVA da via superior de MVA, sendo que os ácidos nucleicos da via superior de MVA são selecionados do grupo que consiste em ácidos nucleicos de AA-CoA tiola-

se ou acetoacetil-CoA sintase, de HMG-CoA sintase, e de HMG-CoA redutase. Em alguns aspectos, as ditas células compreendem um ou mais ácidos nucleicos que codificam os polipeptídeos da rota de MVA da rota de MVA inferior, sendo que os ácidos nucleicos da rota de MVA inferior são selecionados do grupo que consiste em ácidos nucleicos de MVK, PMK, e MVD. Em alguns aspectos, as ditas células compreendem um ou mais ácidos nucleicos que codificam polipeptídeos da via MVA da via completa de MVA. Em alguns aspectos, as ditas células compreendem adicionalmente um ou mais ácidos nucleicos que codificam um polipeptídeo de isopentenil-difosfato delta-isomerase (IDI). Em outros aspectos de qualquer uma das células aqui descritas, as células compreendem adicionalmente um polipeptídeo de 1-desoxixilulose-5-fosfato sintase (DXS). Em outro aspecto, os ditos um ou mais ácidos nucleicos que codificam um polipeptídeo DXS de (b) é um ácido nucleico heterólogo que codifica um polipeptídeo DXS. Em ainda um outro aspecto, os ditos um ou mais ácidos nucleicos que codificam um polipeptídeo DXS de (b) é uma cópia de um ácido nucleico endógeno que codifica um polipeptídeo DXS. Em outros aspectos de qualquer uma das células aqui descritas, o um ou mais ácidos nucleicos heterólogos é colocado sob um promotor induzível ou um promotor constitutivo. Em outro aspecto, o um ou mais ácidos nucleicos heterólogos são clonados em um plasmídeo multicópia. Em outros aspectos, o um ou mais ácidos nucleicos heterólogos são integrados em um cromossomo das células.

[0012] Em ainda outros aspectos, as células são células bacterianas, algáceas, fúngicas ou de levedura. Em um aspecto, as células são células bacterianas. Em outro aspecto, as células bacterianas são células bacterianas gram-positivas ou células bacterianas gram-negativas. Em alguns aspectos, as células bacterianas são selecionadas do grupo que consiste em células de *E. coli*, *P. citrea*, *B. subtilis*, *B.*

licheniformis, *B. lentus*, *B. brevis*, *B. stearothermophilus*, *B. alkalophilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. clausii*, *B. halodurans*, *B. megaterium*, *B. coagulans*, *B. circulans*, *B. lautus*, *B. thuringiensis*, *S. albus*, *S. lividans*, *S. coelicolor*, *S. griseus*, *Pseudomonas sp.*, *Corynebacteria sp*. e *P. alcaligenes*. Em um aspecto, as células bacterianas são *E. coli*. Em outro aspecto, as células são células algáceas. Em ainda um outro aspecto, as células algáceas são selecionadas do grupo que consiste em algas verdes, algas vermelhas, glaucófitos, cloraracniófitos, euglenófitas, cromista ou dinoflagelados. Em outro aspecto, as células são células fúngicas. Em alguns aspectos, as células fúngicas são fungos filamentosos. Em outro aspecto, as células são células de levedura. Em um aspecto, as células de levedura são selecionadas do grupo que consiste em *Saccharomyces sp.*, *Schizosaccharomyces sp.*, *Pichia sp.*, *ou Candida* sp. Em outro aspecto, as células de levedura são *Saccharomyces cerevisiae*.

[0013] São aqui fornecidas composições compreendendo qualquer uma das células aqui apresentadas.

[0014] Também é fornecido aqui um método de produção de isopreno, compreendendo: (a) cultivar qualquer uma das células recombinantes aqui descritas sob condições adequadas para a síntese de isopreno; e (b) produzir isopreno. Em alguns aspectos, o método compreende, adicionalmente, recuperar o isopreno produzido pelas ditas células recombinantes.

[0015] São aqui fornecidos métodos para produzir isopreno, compreendendo (a) cultivar células recombinantes capazes de produzir isopreno, sendo que as ditas células compreendem um gene *ispA* tendo atividade funcional diminuída e um ou mais ácidos nucleicos que codificam: (i) um polipeptídeo de isopreno sintase, sendo que o polipeptídeo de isopreno sintase é codificado por um ácido nucleico heterólogo; e (ii) um ou mais polipeptídeos da rota do mevalonato (MVA),

sendo que a cultura das ditas células recombinantes em um meio adequado proporciona a produção dos ditos polipeptídeos e a síntese de isopreno; e (b) produzir isopreno. Em alguns aspectos, o método compreende, adicionalmente, recuperar o isopreno produzido pelas ditas células recombinantes. Em outros aspectos dos métodos aqui descritos, o polipeptídeo de isopreno sintase é um polipeptídeo de isopreno sintase de plantas ou variante do mesmo. Em alguns aspectos, o polipeptídeo de isopreno sintase é um polipeptídeo de *Pueraria* ou *Populus* ou um híbrido, *Populus alba x Populus tremula* ou variante dos mesmos. Em outro aspecto, o polipeptídeo de isopreno sintase é selecionado do grupo que consiste em *Pueraria montana* ou *Pueraria lobata*, *Populus tremuloides*, *Populus alba* ou variante dos mesmos, *Populus nigra*, e *Populus trichocarpa* ou variante dos mesmos. Em ainda outros aspectos, o polipeptídeo de isopreno sintase de planta é um polipeptídeo de isopreno sintase de kudzu ou uma variante do mesmo. Em ainda outros aspectos, o polipeptídeo de isopreno sintase de planta é um polipeptídeo de isopreno sintase de *Eucalyptus* ou variante do mesmo. Em alguns aspectos de qualquer um dos métodos aqui descritos, os ditos um ou mais ácidos nucleicos que codificam um ou mais polipeptídeos da rota MVA de (b) é um ácido nucleico heterólogo. Em alguns aspectos, as ditas células compreendem um ou mais ácidos nucleicos que codificam polipeptídeos da via MVA da via superior de MVA, sendo que os ácidos nucleicos da via superior de MVA são selecionados do grupo que consiste em ácidos nucleicos de AA-CoA tiolase ou acetoacetil-CoA sintase, de HMG-CoA sintase, e de HMG-CoA redutase. Em alguns aspectos, as ditas células compreendem um ou mais ácidos nucleicos que codificam os polipeptídeos da rota de MVA da rota de MVA inferior, sendo que os ácidos nucleicos da rota de MVA inferior são selecionados do grupo que consiste em ácidos nucleicos de MVK, PMK, e MVD. Em alguns aspectos, as ditas células

compreendem um ou mais ácidos nucleicos que codificam polipeptídeos da via MVA da via completa de MVA. Em alguns aspectos, as ditas células compreendem adicionalmente um ou mais ácidos nucleicos que codificam um polipeptídeo de isopentenil-difosfato delta-isomerase (IDI). Em outros aspectos de qualquer uma das células aqui descritas, as células compreendem adicionalmente um polipeptídeo de 1-desoxixilulose-5-fosfato sintase (DXS). Em outro aspecto, os ditos um ou mais ácidos nucleicos que codificam um polipeptídeo DXS de (b) é um ácido nucleico heterólogo que codifica um polipeptídeo DXS. Em ainda um outro aspecto, os ditos um ou mais ácidos nucleicos que codificam um polipeptídeo DXS de (b) é uma cópia de um ácido nucleico endógeno que codifica um polipeptídeo DXS.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0016] A **figura 1a** representa concentrações de alimentação de mevalonato durante fermentações de CMP882 e CMP884. A figura 1b representa o acúmulo de mevalonato no meio durante fermentações das cepas CMP882 e CMP884.

[0017] A **figura 2** representa a concentração de farnesil pirofosfato (FPP) durante a fermentação de CMP882 e CMP884.

[0018] A **figura 3** representa a viabilidade celular de CMP882 e CMP884 durante as fermentações.

[0019] A **figura 4** representa a taxa de respiração (CER) durante a fermentação de cepas CMP882 e CMP884.

[0020] A **figura 5** representa a expressão de yddV durante a fermentação na cepa da rota MVA (CMP457) versus a cepa de controle do tipo selvagem (MCM1020).

[0021] A **figura 6** representa a taxa de respiração (CER) durante a fermentação das cepas CMP457 e MCM1020.

[0022] A **figura 7a** representa a curva de crescimento de várias cepas manipuladas produtoras de isopreno (média de testes em dupli-

cata). A figura 7b representa a produtividade específica (em unidades arbitrárias) de várias cepas manipuladas produtoras de isopreno (média de testes em duplicata).

[0023] A **figura 8** representa a sequência de nucleotídeos de um gene sintético IspA (SEQ ID NO:10).

[0024] A **figura 9** representa a sequência de nucleotídeos de pMCM1535 (SEQ ID NO:11).

[0025] A **figura 10** representa o construto plasmidial de pMCM1535.

[0026] A **Figura 11** representa a sequência de nucleotídeos de uma farnesil difosfato sintase de ave, mutante A116W (SEQ ID NO:12).

[0027] A **figura 12** representa a sequência de nucleotídeos de uma farnesil difosfato sintase de ave, mutante 144'W (SEQ ID NO:13).

[0028] A **figura 13** representa o rendimento de isopreno em relação à glicose obtida pela cepa yddV-ispA CMP1082 (quadrados pretos fechados), em comparação à cepa de controle CMP1043 (triângulos fechados) em uma fermentação de 15 L ao longo do tempo.

[0029] A **figura 14** representa a titulação do isopreno obtida pela cepa yddV-ispA CMP1082 (quadrados pretos fechados e abertos), em comparação à cepa de controle CMP1043 (triângulos fechados) em uma fermentação de 15 L ao longo do tempo.

[0030] A **figura 15** representa o índice de produtividade celular (CPI) obtido pela cepa yddV-ispA CMP1082 (quadrados pretos fechados), em comparação à cepa de controle CMP1043 (triângulos fechados) em uma fermentação de 15 L ao longo do tempo.

[0031] A **figura 16** representa a produtividade volumétrica obtida pela cepa yddV-ispA CMP1082 (quadrados pretos fechados), em comparação à cepa de controle CMP1043 (triângulos fechados) em uma fermentação de 15 L ao longo do tempo.

[0032] A **figura 17** representa a produtividade específica obtida

pela cepa yddV-ispA CMP1082 (quadrados pretos fechados), em comparação à cepa de controle CMP1043 (triângulos fechados) em uma fermentação de 15 L ao longo do tempo.

[0033] A **figura 18** representa a sequência de nucleotídeos de um alelo com otimização de códon de *hrcA* para expressão em *E. coli* (SEQ ID NO:14).

[0034] A **Figura 19** apresenta o rendimento de isopreno em glicose atingido em cada fermentação de 15 L ao longo do tempo. CMP1082 (pgl+) é representado por triângulos abertos e CMP1136 (pgl-) é representado por quadrados fechados.

[0035] A **Figura 20** apresenta o rendimento instantâneo de isopreno em glicose atingido em cada fermentação de 15 L ao longo do tempo. CMP1082 (pgl+) é representado por triângulos abertos e CMP1136 (pgl-) é representado por quadrados fechados.

[0036] A **Figura 21** apresenta o índice de produtividade celular (CPI) atingido em cada fermentação de 15 L ao longo do tempo. CMP1082 (pgl+) é representado por triângulos abertos e CMP1136 (pgl-) é representado por quadrados fechados.

[0037] A **Figura 22** apresenta a produtividade volumétrica atingida em cada fermentação de 15 L ao longo do tempo. CMP1082 (pgl+) é representado por triângulos abertos e CMP1136 (pgl-) é representado por quadrados fechados.

[0038] A **Figura 23** apresenta a produtividade específica atingida em cada fermentação de 15 L ao longo do tempo. CMP1082 (pgl+) é representado por triângulos abertos e CMP1136 (pgl-) é representado por quadrados fechados.

[0039] A **Figura 24** apresenta o rendimento de isopreno em relação à glicose atingido em cada fermentação de 15 L ao longo do tempo. Todos os testes que usam o *E.gallinarum* ou *E.casseliflavus* (triângulos e quadrados, respectivamente) atingiram um maior % de rendi-

mento de isopreno em relação à glicose do que os dois testes que usam enzimas da rota superior de *E.faecalis* (losangos abertos e fechados). O % em peso do Rendimento em glicose calculado como isopreno total (t)/[(Peso da Alimentação(0)-Peso da Alimentação (t)+83,5)*0,59)], onde 0,59 é a % em peso de glicose na solução de alimentação de glicose e 83,5 é a quantidade em gramas desta batelada de alimentação no fermentador em t=0. Cada alimentação teve seu % em peso medido de forma independente.

[0040] A **Figura 25** apresenta a produtividade volumétrica atingida em cada fermentação de 15 L ao longo do tempo. Todos os testes que usam o *E.gallinarum* ou *E.casseliflavus* (triângulos e quadrados, respectivamente) atingiram uma maior produtividade volumétrica total do que os dois testes que usam enzimas da rota superior de *E.faecalis* (losangos abertos e fechados). A produtividade volumétrica foi calculada com o uso da seguinte fórmula: Produtividade volumétrica (g/L/h) = [Σ (ER(t)/1000*68,117)]/[t-t_0], onde a soma é de t_0 a t. O tempo do ciclo no tanque não é decomposto em fatores.

[0041] A **Figura 26** apresenta a produtividade específica atingida em cada fermentação de 15 L ao longo do tempo. Todos os testes que usam o *E.gallinarum* ou *E.casseliflavus* (triângulos e quadrados, respectivamente) atingiram uma maior produtividade específica de pico do que os dois testes que usam enzimas da rota superior de *E.faecalis* (losangos abertos e fechados). A produtividade específica foi calculada com o uso da seguinte fórmula: Produtividade específica (mg/L/h/OD) = HgER*68,117 g/mol/OD. HgER é a taxa de evolução de isopreno em (mmol/L/h). OD = densidade óptica = absorbância a 550 nm * fator de diluição em água.

[0042] A **figura 27** representa a concentração de IspA nas cepas definidas.

[0043] A **figura 28** representa o rendimento de isopreno em rela-

ção à glicose obtido em cada fermentação de 15 L ao longo do tempo. As cepas com os sítios RBS modificados, especificamente CMP1286 (RBS9 yddV), CMP1284 (RBS3 yddV), e CMP1275 (RBS1/3 yddV) (círculos abertos, quadrados abertos, e triângulos abertos, respectivamente) obtiveram um % de rendimento cumulativo de isopreno em glicose que foi similar à cepa de controle (DW719, testes 20120526 e 20120565, quadrados fechados e losangos fechados, respectivamente). A % em peso do rendimento em glicose calculada como total de isopreno (t)/[(peso da alimentação (0)-peso da alimentação (t)+83,5)*0,59)], onde 0,59 é a porcentagem, em peso, de glicose na solução de alimentação de glicose e 83,5 é a quantidade em gramas desta batelada de alimentação no fermentador em t=0. Cada alimentação teve sua % em peso medida de forma independente.

[0044] A **figura 29** representa o rendimento instantâneo de isopreno em glicose obtido em cada fermentação de 15 L ao longo do tempo. As cepas com os sítios RBS modificados, especificamente CMP1286 (RBS9 yddV), CMP1284 (RBS3 yddV), e CMP1275 (RBS1/3 yddV) (círculos abertos, quadrados abertos, e triângulos abertos, respectivamente) obtiveram rendimentos instantâneos de pico similares de isopreno em glicose que foram similares à cepa de controle (DW719, testes 20120526 e 20120565, quadrados fechados e losangos fechados, respectivamente). Todas as cepas modificadas obtiveram maiores valores de rendimento instantâneo precocemente no teste e a cepa CMP1284 teve o desempenho mais robusto no final do teste (56 a 64 h EFT). Rendimento instantâneo de isopreno (g/g%) calculado como isopreno produzido

$$(t_1\text{-}t_0)/\text{glicose consumida } (t_1\text{-}t_0)*100.$$

[0045] A **figura 30** representa a produtividade volumétrica obtida em cada fermentação de 15 L ao longo do tempo. As cepas com os sítios RBS modificados, especificamente CMP1286 (RBS9 yddV),

CMP1284 (RBS3 yddV), e CMP1275 (RBS1/3 yddV) (círculos abertos, quadrados abertos, e triângulos abertos, respectivamente) obtiveram uma produtividade volumétrica de isopreno que foi similar à cepa de controle (DW719, testes 20120526 e 20120565, quadrados fechados e losangos fechados, respectivamente). A produtividade volumétrica foi calculada com o uso da seguinte fórmula: Produtividade volumétrica (g/L/h) = $[\Sigma(HGER(t)/1000*68.117)]/[t-t_0]$, onde a soma é de t_0 a t. O tempo do ciclo no tanque não é decomposto em fatores.

[0046] A **Figura 31** apresenta o índice de produtividade celular (CPI) atingido em cada fermentação de 15 L ao longo do tempo. As cepas com os sítios RBS modificados, especificamente CMP1286 (RBS9 yddV), CMP1284 (RBS3 yddV), e CMP1275 (RBS1/3 yddV) (círculos abertos, quadrados abertos, e triângulos abertos, respectivamente) obtiveram um CPI que foi similar à cepa de controle (DW719, testes 20120526 e 20120565, quadrados fechados e losangos fechados, respectivamente). O índice de produtividade celular (CPI) foi calculado usando a seguinte fórmula: CPI = total em gramas de isopreno / total em gramas de peso da célula seco.

[0047] A **figura 32** representa a produtividade específica obtida em cada fermentação de 15 L ao longo do tempo. As cepas com os sítios RBS modificados, especificamente CMP1286 (RBS9 yddV), CMP1284 (RBS3 yddV), e CMP1275 (RBS1/3 yddV) (círculos abertos, quadrados abertos, e triângulos abertos, respectivamente) obtiveram uma produtividade específica de isopreno que foi similar à cepa de controle (DW719, testes 20120526 e 20120565, quadrados fechados e losangos fechados, respectivamente). A produtividade específica foi calculada com o uso da seguinte fórmula: Produtividade específica (mg/L/h/OD) = HgER*68,117 g/mol/OD. HgER é a taxa de evolução de isopreno em (mmol/L/h). OD = densidade óptica = absorbância a 550 nm * fator de diluição em água.

[0048] A **figura 33** representa os níveis de FPP medidos após 32 e 44 horas de fermentação.

[0049] A **figura 34** representa os níveis de GPP medidos após 32 e 44 horas de fermentação.

[0050] A **figura 35** representa os níveis de DMAPP medidos após 32 e 44 horas de fermentação.

[0051] A **figura 36** representa os níveis de IPP medidos após 32 e 44 horas de fermentação.

[0052] A **figura 37** representa o construto plasmidial de pCHL426.

[0053] A **figura 38** representa a sequência de nucleotídeos de pCHL426 (SEQ ID NO: 104).

[0054] A **figura 39** representa o construto plasmidial de pCHL427.

[0055] A **figura 40** representa a sequência de nucleotídeos de pCHL427 (SEQ ID NO:105).

[0056] A **figura 41** representa o crescimento de uma célula hospedeira compreendendo uma variante de isopreno sintase expressa constitutivamente em comparação a células hospedeiras compreendendo uma variante de isopreno sintase induzível.

[0057] A **figura 42** representa a produtividade específica de isopreno a partir de uma célula hospedeira que compreende uma variante de isopreno sintase expressa constitutivamente em comparação a células hospedeiras compreendendo uma variante de isopreno sintase induzível.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0058] A invenção aqui fornecida revela, *entre outros*, composições e métodos para a produção de isopreno em células recombinantes que foram manipuladas para regular negativamente a expressão ou atividade funcional do gene *ispA* durante períodos de tempo precisos durante a fermentação. A invenção tem por base a descoberta de que uma expressão menor do gene *ispA* de células recombinantes du-

rante a fermentação resulta em níveis maiores de produção de isopreno em comparação a células que não possuem atividade funcional reduzida do gene *ispA*. Sem se ater à teoria, acredita-se que a redução da expressão gênica e/ou atividade funcional de *ispA* melhora os rendimentos de isopreno pela redução da produção e acúmulo de moléculas isoprenoides de peso molecular mais alto resultando, assim, em maior disponibilidade de carbono para a síntese de isopreno assim como viabilidade celular otimizada. Entretanto, pelo fato de o gene *ispA* produzir uma enzima que é essencial para o crescimento robusto de bactérias e outros micro-organismos, a eliminação total deste gene, tal como através de uma supressão (knock out) de gene, não é uma opção prática para melhorar os rendimentos de isopreno, já que foi relatado que isto causa crescimento defeituoso (Fukisaki et al., 2005, *J. Biochem.*, 137(3):395-400) ou morte (www.genome.wisc.edu/resources/essential.htm; Baba et al., 2006, *Mol. Syst. Biol.*, 2006.0008) das células. Os inventores solucionaram este problema técnico com base em sua descoberta de que uma menor expressão específica e temporalmente precisa e/ou a atividade funcional do gene *ispA* durante a produção de isopreno (por exemplo, após a fase de fermentação de crescimento linear) resulta em maior rendimento de isopreno, titulação, produtividade celular, produtividade volumétrica, produtividade específica, e viabilidade celular pelas células recombinantes.

TÉCNICAS GERAIS

[0059] A prática da presente invenção empregará, exceto onde indicado em contrário, técnicas convencionais de biologia molecular (inclusive técnicas recombinantes), microbiologia, biologia celular, bioquímica e imunologia, que são no âmbito da prática da técnica. Essas técnicas são completamente explicadas na literatura, "*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*", terceira edição (Sambrook et al., 2001);

"*Oligonucleotide Synthesis*" (M. J. Gait, ed., 1984); "*Animal Cell Culture: A practical approach*", terceira edição (J. R. Masters, ed., 2000); "*Methods in Enzymology*" (Academic Press, Inc.); "*Current Protocols in Molecular Biology*" (F. M. Ausubel et al., eds., 1987, e atualizações de periódico); "*PCR: The polimerase Chain Reaction*", (Mullis et al., eds., 1994). Singleton et al., *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology* 3ª edição revisada., J. Wiley & Sons (New York, EUA, 2006), e *March's Advanced Organic Chemistry Reactions*, *Mechanisms and Structure* 6ª ed., John Wiley & Sons (New York, EUA, 2007), fornecem ao versado na técnica um guia geral para muitos termos usados no presente pedido.

DEFINIÇÕES

[0060] O termo "ispA" pode se referir a qualquer enzima geranil transferase ou farnesil difosfato (FPP) sintase ou qualquer membro da família de enzimas prenil transferases que podem catalisar a condensação de difosfato de isopentenila (IPP) com difosfato de 3,3-dimetilalila (DMAPP) ou difosfato de geranila (GPP) para produzir FPP em qualquer organismo. Em algumas modalidades, ispA é codificado por um gene *ispA*.

[0061] O termo "isopreno" refere-se a 2-metil-1,3-butadieno (n° CAS 78-79-5). Este pode ser o produto de hidrocarboneto C5 volátil final e direto a partir da eliminação de pirofosfato a partir de DMAPP. O mesmo pode não envolver a ligação ou polimerização de moléculas de IPP a moléculas de DMAPP. O termo "isopreno" não se destina, de modo geral, a ficar limitado a seu método de produção, exceto onde indicado em contrário na presente invenção.

[0062] Para uso na presente invenção, o termo "polipeptídeos" inclui polipeptídeos, proteínas, peptídeos, fragmentos de polipeptídeos e polipeptídeos de fusão.

[0063] Para uso na presente invenção, um "polipeptídeo isolado"

não faz parte de uma biblioteca de polipeptídeos, tal como uma biblioteca de 2, 5, 10, 20, 50 ou mais polipeptídeos diferentes e é separado de pelo menos um componente com o qual ele ocorre na natureza. Um polipeptídeo isolado pode ser obtido, por exemplo, por expressão de um ácido nucleico recombinante que codifica o polipeptídeo.

[0064] O termo "polipeptídeo heterólogo" refere-se a um polipeptídeo codificado por uma sequência de ácidos nucleicos derivada de um organismo, uma espécie, ou uma cepa diferente da célula hospedeira. Em algumas modalidades, um polipeptídeo heterólogo não é idêntico a um polipeptídeo de tipo selvagem que se encontra na mesma célula hospedeira na natureza.

[0065] Para uso na presente invenção, um "ácido nucleico" refere-se a dois ou mais desoxirribonucleotídeos e/ou ribonucleotídeos covalentemente ligados um ao outro de forma de cadeia simples ou dupla.

[0066] O termo "ácido nucleico recombinante" refere-se a um ácido nucleico de interesse que é isento de um ou mais ácidos nucleicos (por exemplo, genes) que, no genoma de ocorrência natural do organismo a partir do qual o ácido nucleico de interesse é derivado, flanqueiam o ácido nucleico de interesse. Portanto o termo inclui, por exemplo, um DNA recombinante que é incorporado em um vetor, em um plasmídeo ou vírus de replicação autônoma, ou no DNA genômico de um procarioto ou eucarioto, ou que existe como uma molécula separada (por exemplo, um cDNA, um fragmento de DNA genômico, ou um fragmento de cDNA produzido por PCR ou por digestão com endonuclease de restrição) independente de outras sequências.

[0067] O termo "ácido nucleico heterólogo" refere-se a uma sequência de ácidos nucleicos derivada de um organismo, uma espécie, ou uma cepa diferente da célula hospedeira. Em algumas modalidades, o ácido nucleico heterólogo não é idêntico a um ácido nucleico do tipo selvagem que é encontrado na mesma célula hospedeira na natureza.

[0068] Para uso na presente invenção, uma "sequência de controle de expressão" significa uma sequência de ácidos nucleicos que dirige a transcrição de um ácido nucleico de interesse. Uma sequência de controle de expressão pode ser um promotor, como um promotor constitutivo ou um promotor induzível, ou pode ser um intensificador. Uma sequência de controle de expressão pode ser "nativa" ou heteróloga. Uma sequência de controle de expressão nativa é derivada do mesmo organismo, espécie ou cepa que o gene sendo expresso. Uma sequência de controle de expressão heteróloga é derivada de um organismo, espécie ou cepa diferente do gene sendo expresso. Um "promotor induzível" é um promotor que é ativo sob regulação do ambiente ou do desenvolvimento.

[0069] Por "ligado de maneira funcional" entende-se uma ligação funcional entre uma sequência de controle de expressão de ácido nucleico (como um promotor) e uma segunda sequência de ácidos nucleicos, sendo que a sequência de controle de expressão dirige a transcrição do ácido nucleico correspondente à segunda sequência.

[0070] Para uso na presente invenção, os termos "meio mínimo" ou "meios mínimos" referem-se ao meio de cultura contendo o mínimo possível de nutrientes para proliferação celular, geralmente sem a presença de aminoácidos. O meio mínimo contém, tipicamente: (1) uma fonte de carbono para a multiplicação de bactérias, (2) vários sais, que podem variar entre as espécies bacterianas e condições de cultivo; e (3) água. A fonte de carbono pode variar significativamente, desde açúcares simples como glicose até hidrolisados mais complexos de outras biomassas, como extrato de levedura, conforme discutido com mais detalhes abaixo. Os sais geralmente fornecem elementos essenciais como magnésio, nitrogênio, fósforo e enxofre, para permitir que as células sintetizem proteínas e ácidos nucleicos. O meio mínimo pode também ser suplementado com agentes seletivos, como antibióti-

cos, para selecionar quanto à manutenção de certos plasmídeos e similares. Por exemplo, se um micro-organismo for resistente a um certo antibiótico, como ampicilina ou tetraciclina, então esse antibiótico pode ser adicionado ao meio para impedir a proliferação de células desprovidas de resistência. O meio pode ser suplementado com outros compostos, conforme necessário para selecionar quanto a características fisiológicas ou bioquímicas desejadas, como aminoácidos específicos e similares.

[0071] Como usado aqui, o termo "isoprenoide" refere-se a uma classe grande e diversificada da classe de ocorrência natural de compostos orgânicos constituídos por duas ou mais unidades de hidrocarbonetos, com cada unidade consistindo em cinco átomos de carbono dispostos em um padrão específico. Os isoprenoides podem incluir, mas não se limitam a, terpenoides (por exemplo, hemiterpenoides, monoterpenoides, sesquiterpenoides, diterpenoides, sesterterpenoides, triterpenoides, tetraterpenoides, e/ou politerpenoides). Para uso na presente invenção, "isopreno" é expressamente excluído da definição de "isoprenoide."

[0072] Como usado aqui, o termo "rendimento em massa" refere-se à massa do produto produzido pelas células recombinantes (como células bacterianas) dividido pela massa da glicose consumida pelas células recombinante, multiplicado por 100.

[0073] Por "produtividade específica," entende-se a massa do produto produzido pela célula bacteriana dividida pelo produto entre o tempo de produção, a densidade de células, e o volume da cultura.

[0074] Por "titulação," entende-se a massa do produto produzido pelas células recombinantes (por exemplo, células bacterianas) dividida pelo volume da cultura.

[0075] Como usado aqui, o termo "índice de produtividade celular (CPI)" se refere à massa do produto produzido pelas células recombi-

nantes (por exemplo, bacterianas) dividida pela massa das células recombinantes produzidas na cultura.

[0076] A menos que definido de outro modo, todos os termos técnicos e científicos usados na presente invenção têm o mesmo significado que o comumente compreendido pelo versado na técnica a qual a invenção pertence.

[0077] Para uso na presente invenção, os termos singulares "um", "uma", "o" e "a" incluem a referência ao plural, a menos que o contexto claramente indique o contrário.

[0078] A intenção é que cada limite numérico máximo mencionado neste relatório descritivo inclua cada um dos limites numéricos inferiores, como se tais limites numéricos inferiores estivessem expressamente registrados no presente documento. Cada limite numérico mínimo mencionado neste relatório descritivo inclui cada um dos limites numéricos superiores, como se tais limites numéricos superiores estivessem expressamente registrados no presente documento. Cada faixa numérica mencionada neste relatório descritivo inclui todas as faixas numéricas mais restritas que estiverem dentro dessa faixa numérica mais ampla, como se tais faixas numéricas mais restritas estivessem expressamente registradas no presente documento.

MICRO-ORGANISMOS RECOMBINANTES CAPAZES DE PRODUÇÃO INTENSIFICADA DE ISOPRENO

[0079] O isopreno (2-metil-1,3-butadieno) é um importante composto orgânico usado em uma ampla variedade de aplicações. Por exemplo, isopreno é empregado como um intermediário ou um material de partida na síntese de numerosas composições químicas e polímeros, inclusive na produção de borracha sintética. O isopreno também é um importante material biológico que é sintetizado naturalmente por muitas plantas e animais. A rota biossintética dependente de mevalonato (rota MVA) é uma via metabólica chave presente em todos os eu-

cariotos superiores e certas bactérias. Além de ser importante para a produção de moléculas usadas em processos tão diversos como a prenilação de proteínas, manutenção da membrana celular, ancoramento de proteínas, e N-glicosilação, a rota do mevalonato fornece uma fonte importante de difosfato de dimetilalila (DMAPP) e difosfato de isopentenila (IPP), que servem como a base para a biossíntese de isoprenoides e isopreno.

[0080] Compostos isoprenoides como isopentenil tRNA, quinonas isoprenoides, e lipídios transportadores de açúcar são sintetizados como parte do metabolismo normal por muitos micro-organismos, inclusive *E. coli* (Fujisaki, et al. (1989) *J. Bacteriol.* 171:5654-5658). Um ponto de ramificação na via sintética para a produção de compostos isoprenoides envolve uma reação catalisada pela enzima farnesil difosfato (FPP) sintase que condensa IPP com DMAPP ou difosfato de geranila (GPP) para produzir FPP. A FPP sintase (EC: 2.5.1.10) pertence à família de enzimas transferases, especificamente aquelas enzimas capazes de transferir grupos arila ou alquila diferentes de grupos metila em reações metabólicas. Outros nomes em comum usados para a FPP sintase incluem geraniltranstransferase, geranil transferase I, prenil transferase, farnesil pirofosfato sintetase, e farnesil pirofosfato sintetase.

[0081] Conforme descrito acima, DMAPP e IPP fornecem a entrada da fonte de carbono de inicial para a biossíntese de isoprenoides e isopreno. A enzima isopreno sintase usa estas moléculas para catalisar a produção de isopreno enquanto a FPP sintase as utiliza para produzir GPP e FPP - que são, então, adicionalmente sintetizadas em moléculas isoprenoides com peso molecular maior. Portanto, sem se limitar à teoria, acredita-se que para células recombinantes manipuladas produzirem isopreno, a atividade enzimática da FPP sintase resulta em disponibilidade de carbono reduzida para a produção de isopre-

no por tornar menos moléculas de DMAPP e IPP disponíveis para conversão em isopreno pela isopreno sintase. Além disso, a maior produção de isoprenoide nas células recombinantes ou em células de outro modo suscetíveis ao acúmulo de isoprenoide está associado a uma pior morfologia e reduzida viabilidade celular.

[0082] Em micro-organismos como *E. coli*, a FPP sintase é codificada pelo gene *ispA* (Fukisaki, et al., (1990), *J. Biochem.* 108:995-1000). O gene *ispA* está situado em um operon ao longo de dois outros genes: o gene *dxs*, que codifica a enzima desoxi-xilulose-5-fosfato sintase (DXS), assim como o gene *xseB* que produz a subunidade pequena da exonuclease VII (Lois et al., (March 3, 1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95(5):2105-2110). A expressão do gene *IspA* foi relatada como sendo necessária para o crescimento robusto de micro-organismos, uma vez que a remoção completa deste gene produz células com taxas de crescimento menores que aquelas das cepas selvagens (Fukisaki et al., 2005, *J. Biochem.*, 137(3):395-400) ou resulta em letalidade da célula (www.genome.wisc.edu/resources/essential.htm; Baba et al., 2006, *Mol. Syst. Biol.*, 2006.0008).

[0083] Células recombinantes que foram manipuladas para produzir isopreno podem exibir duas fases em cultura: 1) uma fase de crescimento na qual as células recombinantes se dividem de uma forma linear e 2) uma fase de fermentação na qual as células utilizam uma fonte de carbono (por exemplo, glicose) para produzir isopreno. Desta forma, em algumas modalidades, as células recombinantes compreendem uma ispA que tem atividade funcional diminuída. Em um aspecto, a atividade funcional de ispA é diminuída apenas durante a fase de fermentação da cultura celular. Em outro aspecto, a atividade funcional de ispA não é diminuída durante a fase de crescimento linear durante a cultura celular. Em alguns aspectos, a atividade funcional de ispA é

diminuída em ambas as fases de crescimento e fermentação da cultura celular. Em ainda um outro aspecto, a atividade funcional de ispA é diminuída em ambas as fases de crescimento e fermentação da cultura celular, mas a redução é maior na fase de fermentação.

[0084] Qualquer método pode ser usado para diminuir a atividade funcional de ispA, como, mas não se limitando a, deleção do gene *ispA*, redução da expressão gênica de *ispA* ou redução da atividade ou disponibilidade do polipeptídeo codificado pelo gene *ispA*. Em outros aspectos, as células recombinantes da presente invenção compreendem um ispA que tem atividade funcional diminuída e um ou mais dentre um grupo de genes envolvidos na biossíntese do isopreno, que permitem a síntese de isopreno no micro-organismo hospedeiro. Em outro aspecto, as células hospedeiras recombinantes da presente invenção compreendem um gene *ispA* recombinante que teve otimização de códons para expressão em células hospedeiras. Em alguns aspectos, o gene *ispA* com otimização de códons é integrado no genoma da célula hospedeira. Em outros aspectos, o gene *ispA* com otimização de códons é expresso em um pedaço de DNA extracromossômico (como um plasmídeo). Em outro aspecto, o gene *ispA* com otimização de códons é integrado no genoma da célula hospedeira no lócus yhfS e o gene *ispA* endógeno é deletado.

[0085] Em alguns aspectos, as células hospedeiras recombinantes da presente invenção compreendem um gene *ispA* recombinante que codifica uma FPP sintase com um valor de Km aumentado (por exemplo, uma FPP sintase de ave) para DMAPP em comparação ao valor de Km para DMAPP exibido pela FPP sintase codificada de forma endógena. Tais FPP sintases com alto Km foram descritas, por exemplo, em Fernandez et al., *Biochemistry*, 2000, 39(50):15316-21. Em outros aspectos, as células hospedeiras recombinantes da presente invenção podem compreender uma FPP sintase com um ótimo de temperatura

diferente (como, mas não se limitando a, à FPP sintase termofílica descrita em Koyama et al., 1993, *J. Biochem.*, 113(3):355-363), uma FPP sintase psicrofílica (como a FPP sintase descrita em Nichols et al., 2004, *J. Bact.*, 186:8508-8515, cujos conteúdos estão aqui incorporados em sua totalidade, a título de referência), ou uma FPP sintase de um procarioto marinho (como a FPP sintase descrita em Ranzer et al., 2009, *Mar. Biotechnol*, 11:62-73). Em alguns aspectos, o gene *ispA* endógeno da célula hospedeira em qualquer uma das células recombinantes aqui descritas é substituído por qualquer um dos genes alternativos que codificam uma FPP sintase aqui descrita. Em outros aspectos, o gene *ispA* recombinante é colocado sob o controle de um promotor induzível ou constitutivo. Em outro aspecto, o gene *ispA* recombinante é expresso em um plasmídeo multicópias. Em ainda um outro aspecto, o gene *ispA* recombinante é integrado em um cromossomo das células hospedeiras.

[0086] Em alguns aspectos, as células hospedeiras recombinantes da presente invenção compreendem um gene *ispA* sob o controle de um promotor fraco (isto é, um promotor que direciona a expressão de um gene *ispA*, em que a quantidade de expressão é menor que aquela observada pelo promotor endógeno ou selvagem de *ispA*). Em alguns aspectos, o promotor que controla a expressão do gene *ispA* expressa o gene *ispA* em um nível mais elevado durante a fase de crescimento linear durante a cultura celular em comparação à expressão do gene *ispA* durante a fase de fermentação.

ATIVIDADE FUNCIONAL DIMINUÍDA DE ISPA

[0087] Em alguns aspectos, as células recombinantes aqui descritas compreendem um ispA que tem atividade funcional diminuída. "Atividade funcional diminuída" neste contexto se refere à capacidade de um polipeptídeo ispA (por exemplo, um polipeptídeo codificado por um gene *ispA*) de converter o IPP e DMAPP em GPP e/ou FPP (isto é, as

moléculas necessárias para a produção subsequente de isoprenoides). Em alguns aspectos, qualquer uma das células recombinantes aqui apresentadas pode compreender um gene *ispA* no qual a atividade funcional de ispA é diminuída de modo que as células produzem menos que cerca de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, ou 100%, inclusive, incluindo quaisquer porcentagens entre estes valores, da concentração de GPP e/ou FPP em comparação à concentração destas moléculas em células que não compreendem um ispA que tem atividade funcional diminuída. Em outro aspecto, células recombinantes que foram manipuladas para produzir isopreno compreendendo um ou mais ácidos nucleicos heterólogos que codificam um polipeptídeo que tem atividade de isopreno sintase, um ou mais ácidos nucleicos heterólogos que codificam um ou membros da rota MVA e um ispA que tem atividade funcional diminuída produzem menos que cerca de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, ou 100%, inclusive, inclusive quaisquer porcentagens entre estes valores, da concentração de GPP e/ou FPP em comparação à concentração destas moléculas em células recombinantes que compreendem um ou mais ácidos nucleicos heterólogos que codificam um ou mais membros da rota MVA, mas que não compreendem um ispA que tem atividade funcional diminuída.

[0088] Em alguns aspectos, qualquer uma das células recombinantes aqui apresentadas pode compreender ispA sendo que a atividade funcional de ispA é diminuída de modo que as células produzem menos que cerca de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, ou 100%, inclusive, incluindo quaisquer porcentagens entre estes valores, da concentração de isoprenoides em comparação à concentração

destas moléculas em células que não compreendem ispA tendo atividade funcional diminuída. Em outros aspectos, qualquer uma das células recombinantes aqui apresentadas pode compreender ispA, em que a atividade funcional do gene *ispA* é diminuída de modo que as células mostrem qualquer um dentre cerca de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, ou 100%, inclusive, incluindo quaisquer porcentagens entre estes valores, de viabilidade aprimorada em comparação à viabilidade de células que não compreendem ispA com atividade funcional diminuída. Em outro aspecto, células recombinantes que foram manipuladas para produzir isopreno compreendendo um ou mais ácidos nucleicos heterólogos que codificam um ou membros da rota MVA e um ispA que tem atividade funcional diminuída podem exibir qualquer um dentre cerca de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, ou 100%, inclusive, incluindo quaisquer porcentagens entre estes valores, de viabilidade aprimorada em comparação à viabilidade de células que compreendem um ou mais ácidos nucleicos heterólogos que codificam um ou mais membros da rota MVA, mas que não compreendem um ispA que tem atividade funcional diminuída. Para uso na presente invenção, "viabilidade aprimorada" significa que há menos células mortas, morrendo, ou de outro modo morfologicamente anormais produzidas durante o curso da fermentação. As anormalidades morfológicas podem incluir, mas não se limitam a, células alongadas e/ou fragmentos celulares de células mortas ou morrendo. Em algumas modalidades, "viabilidade aprimorada" pode significar que um número maior de células estão vivas, conforme determinado através de uma técnica biológica celular, biológica molecular, ou bioquímica que é conhecida na arte (como, mas não se limitando a, seleção de células ativadas por fluorescência (FACS) ou coloração com DiBAC4(3)). Em alguns aspectos, a atividade

de funcional de ispA é diminuída durante a fase de produção de pico de isopreno da fermentação. Em outros aspectos, a atividade funcional de ispA não é diminuída durante a fase de crescimento linear da fermentação.

[0089] Métodos para medir a atividade funcional diminuída de ispA são muitos e são bem conhecidos na técnica. Por exemplo, métodos-padrão podem ser usados para determinar a produção de metabólitos (por exemplo, FPP e GPP) em células, tal como pela extração química de metabólitos de células inteiras seguido de identificação através de espectrometria de massa. De maneira similar, métodos-padrão podem ser usados para avaliar a viabilidade de células com atividade funcional de ispA diminuída, como análise morfológica por microscopia ou pela avaliação do potencial da membrana. As células com potencial de membrana intacto são presumidas como estando vivas e metabolicamente ativas, enquanto as células sem potencial de membrana foram consideradas mortas e metabolicamente inativas.

EXPRESSÃO REDUZIDA DO GENE ISPA

[0090] Em alguns aspectos, a atividade funcional do gene *ispA* é diminuída pela redução da expressão do gene *ispA*. Isto pode incluir deletar o próprio gene *ispA*, tanto no todo ou em parte, ou por reduzir sua expressão através de qualquer quantidade de métodos, conforme descrito aqui ou conhecido do elemento versado na técnica. Em alguns aspectos, promotores podem ser manipulados na célula para controlar a expressão do gene *ispA*. Em um aspecto, um promotor que direciona a expressão do gene *ispA* pode ser reprimido devido ao maior acúmulo de compostos isoprenoides. Quando estes promotores são introduzidos para controlar a expressão de ispA, ispA pode ser reprimido em períodos de tempo que correspondem ao fluxo através da rota do isoprenoide. Entretanto, em períodos de tempo onde o fluxo é baixo, o promotor permanece induzido e assim permite a expressão de

ispA.

EXPRESSÃO REDUZIDA REGULADA TEMPORALMENTE ATRAVÉS DE PROMOTORES AUTORREGULADORES

[0091] Em alguns aspectos, a expressão gênica de *ispA* é diminuída pela colocação do gene *ispA* sob o controle de um promotor autorregulatório. Em certas modalidades, promotores que são reprimidos apenas durante o estágio tardio da fermentação de células recombinantes, que foram manipulados para produzir maiores níveis de isopreno, podem ser usados para reduzir a atividade funcional do gene *ispA*. Sem se ater à teoria, acredita-se na hipótese de que estes promotores são reprimidos durante períodos de maior acúmulo de compostos isoprenoides conforme a fermentação progride. Portanto, a colocação do gene *ispA* sob o controle destes promotores pode ser usada para modular temporalmente a expressão de *ispA*, de modo que ocorra repressão de *ispA* em períodos de tempo que correspondem a um fluxo aumentado através da rota isoprenoide. Entretanto, em períodos de tempo nos quais o fluxo da rota de isoprenoides é baixo, tal como durante a fase de crescimento linear da fermentação, então o promotor irá permanecer induzido e permitirá assim a expressão do gene *ispA*. Este perfil de atividade de assinatura constitui um sistema de controle de expressão de *ispA* autorregulador.

[0092] Consequentemente, em alguns aspectos, qualquer uma das células recombinantes aqui descritas pode compreender um gene *ispA* que tem atividade funcional diminuída, em que a atividade funcional do gene *ispA* é diminuída pela colocação do gene *ispA* sob o controle de um promotor autorregulador. Em alguns aspectos, o promotor autorregulador é selecionado do grupo que consiste em: *efeO*, *kpsC*, *kpsD*, *kpsD*, *kpsE*, *kpsF*, *kpsS*, *kpsU*, *nmpC*, *sodA*, *ybl129*, *ybl130*, *ybl131*, *yddV*, e *ydiU*. Em um aspecto, o gene *ispA* é colocado sob o controle do promotor de *yddV*. Em outros aspectos, o gene *ispA* endó-

geno pode ser deletado do genoma da célula recombinante (por exemplo, uma célula de *E. coli* recombinante) e um novo gene *ispA* pode ser substituído no genoma em um local diferente. Em um aspecto, um gene *ispA* heterólogo é inserido no genoma da célula recombinante (por exemplo, uma célula de *E. coli* recombinante) no lócus yhfS. O gene *ispA* heterólogo pode ser idêntico ao gene *ispA* endógeno deletado ou pode ser um *ispA* de outra fonte. Em outros aspectos, o gene *ispA* heterólogo sob o controle de um promotor autorregulador é expresso extracromossomicamente. Em outro aspecto, as células hospedeiras recombinantes da presente invenção compreendem um gene *ispA* recombinante que teve otimização de códons para expressão em células hospedeiras. Em alguns aspectos, o gene *ispA* com otimização de códons é integrado no genoma da célula hospedeira. Em outro aspecto, o gene *ispA* com otimização de códons está sob o controle de um promotor autorregulador selecionado do grupo que consiste em *efeO*, *kpsC*, *kpsD*, *kpsD*, *kpsE*, *kpsF*, *kpsS*, *kpsU*, *nmpC*, *sodA*, *ybl129*, *ybl130*, *ybl131*, *yddV*, e *ydiU*. Em alguns aspectos, o gene *ispA* com otimização de códons está sob o controle do promotor de *yddV*. Em ainda um outro aspecto, qualquer um dos promotores autorreguladores aqui descritos pode dirigir a expressão de um gene *ispA* selecionado do grupo que consiste em um *ispA* com otimização de códons, um alelo de *ispA* (por exemplo, um alelo de *ispA* de ave) que codifica uma enzima que compreende um Km que é maior em comparação às enzimas codificadas por *ispA* de micro-organismos, e um alelo endógeno de *ispA*.

[0093] Em alguns aspectos, as células recombinantes (como qualquer uma das células recombinantes aqui apresentadas) que expressam um gene *ispA* sob o controle de um promotor autorregulador produzem menos que cerca de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%,

90%, ou 100%, inclusive, incluindo quaisquer porcentagens entre estes valores, da concentração de GPP e/ou FPP em comparação à concentração destas moléculas em células que não compreendem um gene *ispA* sob o controle de um promotor autorregulador. Em outro aspecto, células recombinantes que foram manipuladas para produzir isopreno, que compreendem um ou mais ácidos nucleicos heterólogos que codificam um ou mais membros da rota MVA e um gene *ispA* sob o controle de um promotor autorregulador produzem menos que cerca de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, ou 100%, inclusive, incluindo quaisquer porcentagens entre estes valores, da concentração de GPP e/ou FPP em comparação à concentração destas moléculas em células recombinantes que compreendem um ou mais ácidos nucleicos heterólogos que codificam um ou mais membros da rota MVA mas que não compreendem um gene *ispA* sob o controle de um promotor autorregulador. Em alguns aspectos, células recombinantes (como qualquer uma das células recombinantes aqui apresentadas) que expressam um gene *ispA* sob o controle de um promotor autorregulador produzem menos que cerca de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, ou 100%, inclusive, incluindo quaisquer porcentagens entre estes valores, da concentração de isoprenoides em comparação à concentração destas moléculas em células que não compreendem um gene *ispA* sob o controle de um promotor autorregulador. Em outros aspectos, as células recombinantes (como qualquer uma das células recombinantes aqui apresentadas) que expressam um gene *ispA* sob o controle de um promotor autorregulador mostram qualquer um dentre 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, ou 100%, inclusive, incluindo quaisquer porcentagens entre estes valores, de viabilidade aprimorada

em comparação à viabilidade de células que não compreendem um gene *ispA* sob o controle de um promotor autorregulador. Em outro aspecto, células recombinantes que foram manipuladas para produzir isopreno compreendendo um ou mais ácidos nucleicos heterólogos codificando um ou mais membros da rota MVA e um gene *ispA* sob o controle de um promotor autorregulador podem exibir qualquer um dentre cerca de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, ou 100%, inclusive, incluindo quaisquer porcentagens entre estes valores, de viabilidade aprimorada em comparação à viabilidade de células que compreendem um ou mais ácidos nucleicos heterólogos que codificam um ou mais membros da rota MVA mas que não compreendem um gene *ispA* sob o controle de um promotor autorregulador.

EXPRESSÃO REDUZIDA REGULADA TEMPORALMENTE ATRAVÉS DA PROTEÍNA REPRESSORA HETERÓLOGA HRCA

[0094] Um método alternativo para controlar a expressão de *ispA* usa a proteína repressora transcricional HrcA de *Caulobacter crescentus* (Roberts et al., 1996, *Journal of Bacteriology*, 178(7):1829-1841; Susin et al., 2004, *Journal of Bacteriology*, 186(20): 6759-6767). O gene que codifica HrcA não é encontrado naturalmente em *E. coli* e não há informações conhecidas sugerindo que o elemento CIRCE, que é reconhecido por HrcA, está envolvido em governar a expressão gênica em *E. coli*. Portanto, a incorporação do elemento CIRCE dentro da sequência regulatória que rege a expressão de *ispA* dentro de um sistema produtor de isopreno de *E. coli* permitiria a repressão mediada por HrcA de *ispA*. Além disso, o gene *hrcA* heterólogo pode ser introduzido em um hospedeiro produtor de isopreno de *E. coli*, onde sua expressão pode ser regida por ao menos um dentre vários meios rigidamente regulados.

[0095] Portanto, em alguns aspectos, qualquer uma das células

recombinantes aqui descritas pode compreender um gene *ispA* que tem atividade funcional diminuída, em que a atividade funcional do gene *ispA* é diminuída por uma proteína repressora transcricional HrcA codificada por um gene *hrcA* e em que um elemento CIRCE é manipulado em uma sequência regulatória que rege a expressão de *ispA*. Em alguns aspectos, a expressão de *hrcA* é controlada por um promotor regulado pela fase de crescimento linear identificado dentro do perfil transcricional de células através de uma fermentação para geração de isopreno de grande escala. Em alguns aspectos, o promotor regulado pela fase de crescimento linear é selecionado do grupo que consiste em *otsA*, *amiB*, e *deoC*.

[0096] Em outros aspectos, a expressão de *hrcA* pode ser controlada por uma alça reguladora positiva que é ligada por si só durante a fase de crescimento lenta desejada da fermentação através de um sinal de indução, como uma limitação de nutrientes aguda ou alteração de temperatura. Neste sentido, um peptídeo transativador, como o transativador T, é funcionalmente ligado a um promotor para detecção de um sinal particular. A introdução do sinal de indução irá induzir atividade do promotor de detecção de sinal, que, por sua vez, regula positivamente a expressão do transativador T. Pela ligação de cópias adicionais de genes do transativador T a promotores dependentes do transativador T, uma alça de retroalimentação positiva é iniciada e sustentada quando o sinal de indução é removido. Em outros aspectos, o gene *hrcA* é ligado a pelo menos um promotor dependente do transativador T, resultando em HrcA sendo continuamente expresso durante períodos subsequentes à ativação da alça reguladora positiva. Em determinados aspectos, o gene do transativador T direcionado pelo promotor dependente do transativador T está situado no mesmo operon que o gene *hrcA*. Em outros aspectos, o gene do transativador T direcionado pelos promotores dependentes do transativador T está situado

em um lócus independente que não contém o gene *hrcA*.

[0097] Em alguns aspectos, as células recombinantes (como qualquer uma das células recombinantes aqui apresentadas) que expressam um gene *ispA* sob o controle de uma proteína repressora HrcA produzem menos que cerca de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, ou 100%, inclusive, incluindo quaisquer porcentagens entre estes valores, da concentração de GPP e/ou FPP em comparação à concentração destas moléculas em células que não compreendem um gene *ispA* sob o controle de uma proteína repressora HrcA. Em outro aspecto, células recombinantes que foram manipuladas para produzir isopreno, que compreendem um ou mais ácidos nucleicos heterólogos que codificam um ou mais membros da rota MVA e um gene *ispA* sob o controle de uma proteína repressora HrcA produzem menos que cerca de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, ou 100%, inclusive, incluindo quaisquer porcentagens entre estes valores, da concentração de GPP e/ou FPP em comparação à concentração destas moléculas em células recombinantes que compreendem um ou mais ácidos nucleicos heterólogos que codificam um ou mais membros da rota MVA, mas que não compreendem um gene *ispA* sob o controle de uma proteína repressora HrcA. Em alguns aspectos, as células recombinantes (como qualquer uma das células recombinantes aqui apresentadas) que expressam um gene *ispA* sob o controle de uma proteína repressora HrcA produzem menos que cerca de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, ou 100%, inclusive, incluindo quaisquer porcentagens entre estes valores, da concentração de isoprenoides em comparação à concentração destas moléculas em células que não compreendem um gene *ispA* sob o controle de uma proteína represso-

ra HrcA. Em outros aspectos, células recombinantes como qualquer uma das células recombinantes aqui apresentadas) que expressam um gene *ispA* sob o controle de uma proteína repressora HrcA mostram qualquer um dentre 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, ou 100%, inclusive, incluindo quaisquer porcentagens entre estes valores, de viabilidade aprimorada em comparação à viabilidade de células que não compreendem um gene *ispA* sob o controle de uma proteína repressora HrcA. Em outro aspecto, células recombinantes que foram manipuladas para produzir isopreno compreendendo um ou mais ácidos nucleicos heterólogos codificando um ou mais membros da rota MVA e um gene *ispA* sob o controle de uma proteína repressora HrcA podem exibir qualquer um dentre cerca de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, ou 100%, inclusive, incluindo quaisquer porcentagens entre estes valores, de viabilidade aprimorada em comparação à viabilidade de células que compreendem um ou mais ácidos nucleicos heterólogos que codificam um ou mais membros da rota MVA mas que não compreendem um gene *ispA* sob o controle de uma proteína repressora HrcA.

EXPRESSÃO REDUZIDA REGULADA TEMPORALMENTE ATRAVÉS DA EXPRESSÃO REGULADA POR XILOSE DE *ISPA*

[0098] A expressão gênica regulada mediada pela disponibilidade da fonte de carbono é uma outra alternativa escalonável para controlar a expressão gênica de *ispA* dentro de um hospedeiro de produção (por exemplo, um hospedeiro de produção de *E. coli*). Este método oferece a capacidade de fornecer níveis relativamente normais e/ou suficientes da expressão gênica de *ispA* necessária para células saudáveis e robusta em rápido crescimento, permitindo rápida colocação de biomassa. Além disso, este método oferece a capacidade de restringir a ex-

pressão de *ispA* durante a produção de isopreno suportada por glicose quando se acredita que a atividade da FPP sintase seja prejudicial para a viabilidade celular, resultando em rendimento reduzido do isopreno produzido a partir da glicose.

[0099] Consequentemente, em alguns aspectos, qualquer uma das células recombinantes aqui descritas pode compreender um gene *ispA* que tem atividade funcional diminuída, em que a atividade funcional do gene *ispA* é diminuída pela colocação do gene *ispA* sob o controle direto de um promotor regulado por xilose. Em alguns aspectos, a expressão de *ispA* em células recombinantes (como uma célula de *E. coli* recombinante) é colocada sob o controle direto de promotores endógenos de *xylA* ou *xylF* ou sob o controle de qualquer promotor que se influencie positivamente pela D-xilose e negativamente pela glicose dentro da célula recombinante. Isto é realizado pela deleção do gene *ispA* endógeno e substituição de um *ispA* heterólogo sob o controle de promotores responsivos à D-xilose de *xylA* ou *xylF*. Os promotores divergentes *xylA-xylF* de *E. coli* e sua regulação positiva através de D-xilose e do ativador transcricional XylR assim como sua regulação negativa pela glicose e repressão de catabólito foram descritos (S. Song e C. Park, 1997, *J. Bacterial.*, 179(22):7025-7032). Em alguns aspectos, a expressão gênica de *ispA* é regida positivamente pela disponibilidade da xilose na ausência de glicose e negativamente pela presença de glicose. Em alguns aspectos, o lócus de *ispA* induzível por xilose está presente dentro do cromossomo da célula recombinante (como uma célula de *E. coli* recombinante), mas alternativamente, pode, também, ser codificado em uma sequência de nucleotídeos extracromossômica como um plasmídeo. A construção do construto de *ispA* induzível por xilose e sua introdução no hospedeiro de *E. coli* produtor de isopreno podem ser feitos usando técnicas moleculares e de microbiologia padrão (J. Sambrook, E. F. Fritsch, e T. Maniatis Cold Spring

Harbor Laboratory Press, NY. 1989).

[00100] Em alguns aspectos, as células recombinantes (como qualquer uma das células recombinantes aqui apresentadas) expressando um gene *ispA* sob o controle de um promotor induzível por xilose produzem menos que cerca de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, ou 100%, inclusive, incluindo quaisquer porcentagens entre estes valores, da concentração de GPP e/ou FPP em comparação à concentração destas moléculas em células que não compreendem um gene *ispA* sob o controle de um promotor induzível por xilose. Em outro aspecto, células recombinantes que foram manipuladas para produzir isopreno compreendendo um ou mais ácidos nucleicos heterólogos codificando um ou mais elementos da rota MVA e um gene *ispA* sob o controle de um promotor induzível por xilose produzir menos que cerca de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, ou 100%, inclusive, incluindo quaisquer porcentagens entre estes valores, da concentração de GPP e/ou FPP em comparação à concentração destas moléculas em células recombinantes que compreendem um ou mais ácidos nucleicos heterólogos que codificam um ou mais membros da rota MVA mas que não compreendem um gene *ispA* sob o controle de um promotor induzível por xilose. Em alguns aspectos, as células recombinantes (como qualquer uma das células recombinantes aqui apresentadas) expressando um gene *ispA* sob o controle de um promotor induzível por xilose produzem menos que cerca de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, ou 100%, inclusive, incluindo quaisquer percentages entre estes valores, da concentração de isoprenoides em comparação à concentração destas moléculas em células que não compreendem um gene *ispA* sob o controle de um promotor indu-

zível por xilose. Em outros aspectos, as células recombinantes (como qualquer uma das células recombinantes aqui apresentadas) que expressam um gene *ispA* sob o controle de um promotor induzível por xilose mostram qualquer um dentre 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, ou 100%, inclusive, incluindo quaisquer percentages entre estes valores, de viabilidade aprimorada em comparação à viabilidade de células que não compreendem um gene *ispA* sob o controle de um promotor induzível por xilose. Em outro aspecto, células recombinantes que foram manipuladas para produzir isopreno, compreendendo um ou mais ácidos nucleicos heterólogos que codificam um ou mais elementos da rota MVA e um gene *ispA* sob o controle de um promotor induzível por xilose podem exibir qualquer um de cerca de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, ou 100%, inclusive, incluindo quaisquer percentages entre estes valores, de viabilidade aprimorada em comparação à viabilidade das células que compreendem um ou mais ácidos nucleicos heterólogos que codificam um ou mais membros da rota MVA mas que não compreendem um gene *ispA* sob o controle de um promotor induzível por xilose.

ATIVIDADE DIMINUÍDA DA FPP SINTASE

[00101] Em alguns aspectos, a atividade funcional do gene *ispA* é diminuída pela redução da atividade da proteína IspA, FPP sintase. Isto pode incluir inibir a tradução do mRNA de IspA ou por degradar a FPP sintase em si através de qualquer quantidade de métodos, conforme descrito aqui.

FUSÃO TRADUCIONAL DA PROTEÍNA ISPA COM UMA ETIQUETA PROTEOLÍTICA PARA DIMINUIR A ATIVIDADE DE PROTEÍNA

[00102] Em alguns aspectos de qualquer uma das células recombinantes aqui descritas, a FPP sintase é direcionada para degradação

proteolítica por manipulação de uma sequência de DNA em um gene *ispA* que codifica uma etiqueta de proteína de 11 aminoácidos (Andersen et al., 1998, *Appl Environ Microbiol.*, 64(6):2240-2246). A etiqueta de tmRNA proteolítico então direciona a FPP sintase para degradação nas células hospedeiras, diminuindo assim a atividade da FPP sintase. Em alguns aspectos, a etiqueta proteolítica é fundida à terminação C da proteína FPP sintase. Em outros aspectos, a etiqueta proteolítica é fundida à terminação N da proteína FPP sintase.

[00103] Em alguns aspectos, células recombinantes (como qualquer uma das células recombinantes aqui apresentadas) que expressam uma proteína FPP sintase fundida a uma etiqueta proteolítica produzem menos que cerca de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, ou 100%, inclusive, incluindo quaisquer percentages entre estes valores, da concentração de GPP e/ou FPP em comparação à concentração destas moléculas em células que não compreendem uma proteína FPP sintase fundida a uma etiqueta proteolítica. Em outro aspecto, células recombinantes (como qualquer uma das células recombinantes aqui apresentadas) que expressam uma proteína FPP sintase fundida a uma etiqueta proteolítica que foram manipuladas para produzir isopreno compreendendo um ou mais ácidos nucleicos heterólogos que codificam um ou membros da rota MVA produzem menos que cerca de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, ou 100%, inclusive, incluindo quaisquer percentages entre estes valores, da concentração de GPP e/ou FPP em comparação à concentração destas moléculas em células recombinantes que compreendem um ou mais ácidos nucleicos heterólogos que codificam um ou mais membros da rota MVA, mas que não compreendem uma proteína FPP sintase fundida a uma etiqueta proteolítica. Em alguns aspectos, células recombinantes (co-

mo qualquer uma das células recombinantes aqui apresentadas) que expressam uma proteína FPP sintase fundida a uma etiqueta proteolítica produzem menos que cerca de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, ou 100%, inclusive, incluindo quaisquer percentages entre estes valores, da concentração de isoprenoides em comparação à concentração destas moléculas em células que não compreendem uma proteína FPP sintase fundida a uma etiqueta proteolítica. Em outros aspectos, células recombinantes (como qualquer uma das células recombinantes aqui apresentadas) que expressam uma proteína FPP sintase fundida a uma etiqueta proteolítica mostram qualquer um dentre 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, ou 100%, inclusive, incluindo quaisquer percentages entre estes valores, de viabilidade aprimorada em comparação à viabilidade de células que não compreendem uma proteína IspA fundida a uma etiqueta proteolítica. Em outro aspecto, células recombinantes (como qualquer uma das células recombinantes aqui apresentadas) que expressam uma proteína FPP sintase fundida a uma etiqueta proteolítica compreendendo um ou mais ácidos nucleicos heterólogos que codificam um ou membros da rota MVA e um gene *ispA* podem exibir qualquer um dentre cerca de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, ou 100%, inclusive, incluindo quaisquer percentages entre estes valores, de viabilidade aprimorada em comparação à viabilidade de células que compreendem um ou mais ácidos nucleicos heterólogos que codificam um ou mais membros da rota MVA, mas que não compreendem uma proteína FPP sintase fundida a uma etiqueta proteolítica.

EXPRESSÃO DA PROTEÍNA ISPA DIMINUÍDA ATRAVÉS DO USO DE MRNA ANTISSENSO E MUTAÇÕES DE LIGAÇÃO RIBOSSOMAL

[00104] Em alguns aspectos, o mRNA antissenso direcionado em direção ao mRNA de ispA é usado para impedir a tradução do mRNA de ispA na proteína IspA e resulta em expressão diminuída da proteína IspA O antissenso é bem conhecido na técnica e tem sido usado em *E. coli*, entre outros organismos, para reduzir a produção de moléculas como acetato (Kim J. e Cha H.J., 2003, *Biotech Bioeng*., 83:841-853) ou para manipular um fenótipo de supressão de catalase (Chan E. et al., 2010, *J. Exp. Microbiol Immunol*., 14:127-134). O design de construtos antissenso direcionados ao gene ispA de *E. coli* pode ser preparado usando métodos descritos por Shao Y. et al., 2006, *Nucleic Acids Res*., 34:5660-5669. As moléculas de RNA antissenso podem ser estabilizadas usando terminações emparelhadas (Nakashima N. et al., 2006, *Nucleic Acids Res*., 34:e138). Em alguns aspectos, o oligonucleotídeo antissenso tem cerca de 150 bp de comprimento. A tradução diminuída do mRNA de ispA devido ao tratamento com mRNA antissenso pode ser medida por quaisquer meios conhecidos na técnica incluindo, mas não se limitando a, ensaios de atividade enzimática, Western Blot, Northern Blot, ou RT-PCR.

[00105] Em outros aspectos, a expressão da proteína IspA é diminuída através da introdução de uma ou mais mutações em um ou mais sítios de ligação ribossomais localizados na molécula de mRNA de ispA. A introdução de mutações de ligação ribossomal interfere ou elimina a tradução do mRNA de IspA, levando à expressão diminuída da proteína IspA. A tradução diminuída do mRNA de ispA devido à introdução de uma ou mais mutações em um ou mais sítios de ligação ribossomal localizados na molécula de mRNA de ispA pode ser medida por quaisquer meios conhecidos na técnica incluindo, mas não se limitando a, ensaios de atividade enzimática ou Western Blot.

[00106] A localização dos sítios de ligação de ribossomal (RBSs) em um mRNA particular pode ser identificada usando programas de

otimização conhecidos na técnica. Por exemplo, um programa de otimização de calculadora de RBS que usa parâmetros termodinâmicos do RNA pode ser usado em conjunto com o pacote Vienna RNA v.1.8.4 (disponível em world.wide.web.tbi.univie.ac.at/~ivo/RNA/, Gruber *et al.*, (NAR, 2008) e o modelo de RNA Vienna para a calculadora de RBS. Este programa de otimização de calculadora de RBS pode ser usado para identificar RBSs com um efeito previsto sobre a expressão de proteína. Por exemplo, RBSs que forneceriam menor expressão de uma proteína-alvo (por exemplo, ispA) podem ser identificados usando um programa de otimização de calculadora de RBS.

ÁCIDOS NUCLEICOS E POLIPEPTÍDEOS DE ISOPRENO SINTASE

[00107] Em alguns aspectos da invenção, as células recombinantes descritas em qualquer uma das composições ou métodos aqui descritos compreendem adicionalmente um ou mais ácidos nucleicos que codificam um polipeptídeo de isopreno sintase ou um polipeptídeo que tem atividade de isopreno sintase. Em alguns aspectos, o polipeptídeo de isopreno sintase é um polipeptídeo endógeno. Em alguns aspectos, o ácido nucleico endógeno que codifica um polipeptídeo de isopreno sintase está ligado de maneira funcional a um promotor constitutivo. Em alguns aspectos, o ácido nucleico endógeno que codifica um polipeptídeo de isopreno sintase está ligado de maneira funcional a um promotor induzível. Em alguns aspectos, o ácido nucleico endógeno que codifica um polipeptídeo de isopreno sintase está ligado de maneira funcional a um promotor forte. Em alguns aspectos, mais de um ácido nucleico endógeno que codifica um polipeptídeo de isopreno sintase é usado (por exemplo 2, 3, 4, ou mais cópias de um ácido nucleico endógeno que codifica um polipeptídeo de isopreno sintase). Em um aspecto particular, as células são manipuladas para superexpressar o polipeptídeo da rota de isopreno sintase endógena em relação às células selvagens. Em alguns aspectos, o ácido nucleico endógeno

que codifica um polipeptídeo de isopreno sintase está ligado de maneira funcional a um promotor fraco. Em alguns aspectos, o polipeptídeo de isopreno sintase é um polipeptídeo de *Pueraria* ou *Populus* ou um híbrido como *Populus alba x Populus tremula*. Em alguns aspectos, o polipeptídeo de isopreno sintase é de *Eucalyptus*.

[00108] Em alguns aspectos, o polipeptídeo de isopreno sintase é um polipeptídeo heterólogo. Em alguns aspectos, as células compreendem mais de uma cópia de um ácido nucleico heterólogo que codifica um polipeptídeo de isopreno sintase. Em alguns aspectos, o ácido nucleico heterólogo que codifica um polipeptídeo de isopreno sintase está ligado de maneira funcional a um promotor constitutivo. Em alguns aspectos, o ácido nucleico heterólogo que codifica um polipeptídeo de isopreno sintase está ligado de maneira funcional a um promotor induzível. Em alguns aspectos, o ácido nucleico heterólogo que codifica um polipeptídeo de isopreno sintase está ligado de maneira funcional a um promotor forte. Em alguns aspectos, o ácido nucleico heterólogo que codifica um polipeptídeo de isopreno sintase está ligado de maneira funcional a um promotor fraco.

[00109] Os ácidos nucleicos que codificam um polipeptídeo de isopreno sintase podem ser integrados em um genoma das células hospedeiras ou podem ser expressos de maneira estável nas células. Os ácidos nucleicos que codificam um polipeptídeo de isopreno sintase podem, adicionalmente, estar em um vetor.

[00110] Ácidos nucleicos de isopreno sintase exemplificadores incluem ácidos nucleicos que codificam um polipeptídeo, fragmento de um polipeptídeo, peptídeo, ou polipeptídeo de fusão que tenha pelo menos uma atividade de um polipeptídeo de isopreno sintase. Polipeptídeos de isopreno sintase convertem difosfato de dimetilalila (DMAPP) em isopreno. Polipeptídeos de isopreno sintase exemplificadores incluem polipeptídeos, fragmentos de polipeptídeos, peptídeos, e poli-

peptídeos de fusão que têm pelo menos uma atividade de um polipeptídeo de isopreno sintase. Polipeptídeos e ácidos nucleicos de isopreno sintase exemplificadores incluem polipeptídeos de ocorrência natural e ácidos nucleicos de qualquer um dos organismos fonte descritos no presente documento. Além disso, as variantes de isopreno sintase podem possuir atividade aprimorada como atividade enzimática aprimorada. Em alguns aspectos, uma variante de isopreno sintase tem outras propriedades aprimoradas, tal como estabilidade aprimorada (por exemplo, estabilidade térmica), e/ou solubilidade aprimorada.

[00111] Métodos padrão podem ser usados para determinar se um polipeptídeo tem atividade de polipeptídeo de isopreno sintase ao medir a habilidade de o polipeptídeo de converter DMAPP em isopreno *in vitro*, em um extrato celular, ou *in vivo*. A atividade do polipeptídeo de isopreno sintase no extrato celular pode ser medida, por exemplo, conforme descrito em Silver *et al.*, 1995, *J. Biol. Chem*. 270:13010-13016. Em um ensaio exemplificador, DMAPP (Sigma) pode ser evaporado até secura sob uma corrente de nitrogênio e re-hidratado até uma concentração de 100 mM em tampão de fosfato de potássio a 100 mM, pH 8,2 e armazenado a -20 0C. Para realizar o ensaio, uma solução de 5 µL de $MgCl_2$ 1 M, 1 mM (250 µg/ml) de DMAPP, 65 µL de tampão de extratos vegetais (PEB) (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, $MgCl_2$ 20 mM, 5% de glicerol, e DTT 2 mM) pode ser adicionada a 25 µL de extrato celular em um frasco com espaço livre ("headspace") de 20 ml com uma tampa de rosca de metal e septo de silício revestido com teflon (Agilent Technologies) e cultivada a 370C durante 15 minutos com agitação. A reação pode ser bruscamente arrefecida ao acrescentar 200 µL de 250 mM de EDTA e quantificada por CG/EM.

[00112] Em alguns aspectos, o polipeptídeo de isopreno sintase é um polipeptídeo de isopreno sintase de planta ou uma variante do mesmo. Em alguns aspectos, o polipeptídeo de isopreno sintase é

uma isopreno sintase de *Pueraria* ou uma variante do mesmo. Em alguns aspectos, o polipeptídeo de isopreno sintase é uma isopreno sintase de Populus ou uma variante do mesmo. Em alguns aspectos, o polipeptídeo de isopreno sintase é um polipeptídeo de isopreno sintase de álamo ou uma variante do mesmo. Em alguns aspectos, o polipeptídeo de isopreno sintase é um polipeptídeo de isopreno sintase de kudzu ou uma variante do mesmo. Em alguns aspectos, o polipeptídeo de isopreno sintase é um polipeptídeo de *Pueraria* ou *Populus* ou um híbrido, *Populus alba x Populus tremula*, ou uma variante do mesmo.

[00113] Em alguns aspectos, o polipeptídeo de isopreno sintase ou ácido nucleico é da família de Fabaceae, como da subfamília de Faboideae. Em alguns aspectos, o polipeptídeo de isopreno sintase ou ácido nucleico é um polipeptídeo ou ácido nucleico de *Pueraria montana* (kudzu) (Sharkey *et al.*, 2005, *Plant Physiology* 137: 700-712), *Pueraria lobata*, poplar (como *Populus alba*, *Populus nigra*, *Populus trichocarpa*, ou *Populus alba x tremula* (CAC35696) (Miller *et al.*, 2001, *Planta* 213: 483-487), aspen (como *Populus tremuloides*) (Silver *et al.*, 1995, JBC 270(22): 13010-1316), English Oak (*Quercus robur*) (Zimmer *et al.*, WO 98/02550), ou uma variante dos mesmos. Em alguns aspectos, o polipeptídeo de isopreno sintase é uma isopreno sintase de *Pueraria montana*, *Pueraria lobata*, *Populus tremuloides*, *Populus alba*, *Populus nigra*, ou *Populus trichocarpa* ou uma variante do mesmo. Em alguns aspectos, o polipeptídeo de isopreno sintase é uma isopreno sintase de *Populus alba* ou uma variante do mesmo. Em alguns aspectos, a isopreno sintase é *Populus balsamifera* (Genbank JN173037), *Populus deltoides* (Genbank JN173039), *Populus fremontii* (Genbank JN173040), *Populus granidident*a (Genbank JN173038), Salix (Genbank JN173043), *Robinia pseudoacacia* (Genbank JN173041), *Wisteria* (Genbank JN173042), *Eucalyptus globulus* (Genbank AB266390) ou *Melaleuca alterniflora* (Genbank AY279379) ou variante

dos mesmos. Em alguns aspectos, o ácido nucleico que codifica a isopreno sintase (por exemplo, isopreno sintase de *Populus alba* ou uma variante do mesmo) tem otimização de códons.

[00114] Em alguns aspectos, o ácido nucleico ou polipeptídeo de isopreno sintase é um polipeptídeo ou ácido nucleico de ocorrência natural (por exemplo, polipeptídeo ou ácido nucleico de ocorrência natural de *Populus*). Em alguns aspectos, o ácido nucleico ou polipeptídeo de isopreno sintase não é um polipeptídeo ou ácido nucleico de tipo selvagem ou de ocorrência natural. Em alguns aspectos, o ácido nucleico ou polipeptídeo de isopreno sintase é uma variante de um polipeptídeo ou ácido nucleico de tipo selvagem ou de ocorrência natural (por exemplo, uma variante de um polipeptídeo ou ácido nucleico de tipo selvagem ou de ocorrência natural de *Populus*).

[00115] Em alguns aspectos, o polipeptídeo de isopreno sintase é uma variante. Em alguns aspectos, o polipeptídeo de isopreno sintase é uma variante de uma isopreno sintase de tipo selvagem ou de ocorrência natural. Em alguns aspectos, a variante tem atividade aprimorada, tal como atividade catalítica aprimorada em comparação com a isopreno sintase de tipo selvagem ou de ocorrência natural. O aumento na atividade (por exemplo, atividade catalítica) pode ser de ao menos cerca de qualquer um de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, ou 95%. Em alguns aspectos, o aumento na atividade, tal como atividade catalítica, é de ao menos cerca de qualquer um de 1 vez, 2 vezes, 5 vezes, 10 vezes, 20 vezes, 30 vezes, 40 vezes, 50 vezes, 75 vezes, ou 100 vezes. Em alguns aspectos, o aumento na atividade, tal como atividade catalítica, é de cerca de 10% a cerca de 100 vezes (por exemplo, cerca de 20% a cerca de 100 vezes, cerca de 50% a cerca de 50 vezes, cerca de 1 vez a cerca de 25 vezes, cerca de 2 vezes a cerca de 20 vezes, ou cerca de 5 vezes a cerca de 20 vezes). Em alguns aspectos, a variante tem solubilidade aprimorada em com-

paração com a isopreno sintase de tipo selvagem ou de ocorrência natural. O aumento na solubilidade pode ser de ao menos cerca de qualquer um de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, ou 95%. O aumento na solubilidade pode ser ao menos cerca de qualquer um de 1 vez, 2 vezes, 5 vezes, 10 vezes, 20 vezes, 30 vezes, 40 vezes, 50 vezes, 75 vezes, ou 100 vezes. Em alguns aspectos, o aumento na solubilidade é de cerca de 10% a cerca de 100 vezes (por exemplo, cerca de 20% a cerca de 100 vezes, cerca de 50% a cerca de 50 vezes, cerca de 1 vez a cerca de 25 vezes, cerca de 2 vezes a cerca de 20 vezes, ou cerca de 5 vezes a cerca de 20 vezes). Em alguns aspectos, o polipeptídeo de isopreno sintase é uma variante da isopreno sintase de ocorrência natural e tem estabilidade aprimorada (tal como estabilidade térmica) em comparação à isopreno sintase de ocorrência natural. Em alguns aspectos, o polipeptídeo de isopreno sintase é de *Eucalyptus*, ou uma variante do mesmo. Em outros aspectos, a isopreno sintase é de *Robinia*, *Salix*, ou *Melaleuca*, ou variantes dos mesmos.

[00116] Em alguns aspectos, a variante tem ao menos cerca de 10%, ao menos cerca de 20%, ao menos cerca de 30%, ao menos cerca de 40%, ao menos cerca de 50%, ao menos cerca de 60%, ao menos cerca de 70%, ao menos cerca de 80%, ao menos cerca de 90%, ao menos cerca de 100%, ao menos cerca de 110%, ao menos cerca de 120%, ao menos cerca de 130%, ao menos cerca de 140%, ao menos cerca de 150%, ao menos cerca de 160%, ao menos cerca de 170%, ao menos cerca de 180%, ao menos cerca de 190%, ao menos cerca de 200% da atividade de uma isopreno sintase de tipo selvagem ou de ocorrência natural. A variante pode compartilhar similaridade de sequência com uma isopreno sintase de tipo selvagem ou de ocorrência natural. Em alguns aspectos, uma variante de uma isopreno sintase de tipo selvagem ou de ocorrência natural pode ter ao

menos cerca de qualquer um de 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, ou 99,9% de identidade de sequências de aminoácido com aquela da isopreno sintase tipo selvagem ou de ocorrência natural. Em alguns aspectos, uma variante de uma isopreno sintase tipo selvagem ou de ocorrência natural tem qualquer um de cerca de 70% a cerca de 99,9%, cerca de 75% a cerca de 99%, cerca de 80% a cerca de 98%, cerca de 85% a cerca de 97%, ou cerca de 90% a cerca de 95% de identidade de sequências de aminoácido com a da isopreno sintase tipo selvagem ou de ocorrência natural.

[00117] Em alguns aspectos, a variante compreende uma mutação na isopreno de tipo sintase selvagem ou de ocorrência natural. Em alguns aspectos, a variante tem pelo menos uma substituição de aminoácido, pelo menos uma inserção de aminoácido, e/ou pelo menos uma deleção de aminoácido. Em alguns aspectos, a variante tem pelo menos uma substituição de aminoácido. Em alguns aspectos, o número de diferentes resíduos de aminoácido entre a isopreno sintase variante e a de tipo selvagem ou de ocorrência natural pode ser um ou mais, por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, ou mais resíduos de aminoácido. As isopreno sintases de ocorrência natural podem incluir quaisquer isopreno sintases de plantas, por exemplo, isopreno sintases de uva kudzu, isopreno sintases de choupo, isopreno sintases de carvalho inglês, e isopreno sintases de salgueiro. Em alguns aspectos, a variante é uma variante de isopreno sintase de *Populus alba*. Em alguns aspectos, a variante da isopreno sintase de *Populus alba* tem pelo menos uma substituição de aminoácido, pelo menos uma inserção de aminoácido, e/ou pelo menos uma deleção de aminoácido. Em alguns aspectos, a variante é uma isopreno sintase de *Populus alba* truncada. Em alguns aspectos, o ácido nucleico que codifica a variante (por exemplo, variante de isopreno sintase de *Populus alba*) é otimiza-

do (por exemplo, com códons otimizados com base nas células hospedeiras onde a isopreno sintase heteróloga é expressa). Em alguns aspectos, o polipeptídeo de isopreno sintase é de *Eucalyptus*, ou uma variante do mesmo. Em outros aspectos, a isopreno sintase é de *Robinia*, *Salix*, ou *Melaleuca*, ou variantes dos mesmos.

[00118] O polipeptídeo de isopreno sintase aqui fornecido pode ser qualquer uma das isopreno sintases ou variantes de isopreno sintase descritas no WO 2009/132220, WO 2010/124146, e publicação de pedido de patente US n° 2010/0086978, cujos conteúdos estão expressamente aqui incorporados a título de referência nas suas totalidades com relação às isopreno sintases e variantes de isopreno sintase.

[00119] Qualquer um dos promotores aqui descritos (por exemplo, promotores aqui descritos e identificados nos exemplos da presente descrição, inclusive promotores induzíveis e promotores constitutivos) podem ser usados para direcionar a expressão de qualquer uma das isopreno sintases aqui descritas.

[00120] As isopreno sintases adequadas incluem, mas não se limitam a, aquelas identificadas pelos n°s de Acesso Ge nbank AY341431, AY316691, AY279379, AJ457070 e AY182241. Os tipos de isopreno sintases que pode ser usados em qualquer uma das composições ou métodos, incluindo métodos de preparo de micro-organismos que codificam a isopreno sintase aqui descrita também são descritos nas publicações de pedidos de patente internacionais N°s WO 2009/076676, WO 2010/003007, WO 2009/132220, WO 2010/031062, WO 2010/031068, WO 2010/031076, WO 2010/013077, WO 2010/031079, WO 2010/148150, WO 2010/124146, WO 2010/078457, WO 2010/148256, e Sharkey et al., "*Isoprene Synthase Genes Form A Monophyletic Clade Of Acyclic Terpene Synthases In The Tps-B Terpene Synthase Family*", Evolution (2012) (disponível online em DOI: 10.1111/evo.12013), estando o conteúdo dos mesmos aqui incorpora-

do a título de referência.

[00121] Diversas variantes de isopreno sintase podem ser feitas com substituições nos locais de resíduos mostrados na Tabela A. Qualquer uma das variantes descritas aqui (inclusive nas Tabelas A, nas reivindicações, ou nos Exemplos) pode ser usada nas composições e métodos da invenção. Em alguns aspectos, a variante compreende uma ou mais (isto é, 2, 3, 4, 5, 6, etc.) mutações da tabela A que corresponde à sequência de aminoácidos de *P. alba*.

Tabela A: Variantes de Isopreno Sintase de *P. Alba* (MEA)				
A118E	E472R	S510V	K161K	A118P
S22K	K463F	I342I	W392A	A118Q
S21R	K463T	K348F	W392C	A118A
S22K	R71K	K348Y	W392F	E41M
S22R	R71L	K348K	S288Y	G111S
E58L	R71M	C437L	M228Y	S74Q
T481V	R71V	T240C	A3T	S74S
T481Y	R71R	M460M	W392Y	K36D
T502F	K393L	R461A	W392W	S282H
T381L	F542L	H424P	F89D	S282I
T381M	P538K	H424H	F89E	S282W
T381Y	P538R	A448L	F89F	S282Y
T383H	P538P	A448Q	E41Y	S282S
T383L	A503A	A448V	E41E	K36S
E480I	L436I	G389D	R43E	K36T
E480R	L436Y	S444E	R43L	K36W
K393V	L436F	S444S	K36E	K36Y
K393I	E488L	H511Y	K36H	K36K
E415H	E488M	H511H	K36N	
E415V	E488T	R071I	K36P	
E415Y	E488W	R071K	K36Q	
R71H	E488E	R071L	A453I	

Tabela A: Variantes de Isopreno Sintase de *P. Alba* (MEA)				
R71I	I342Y	K374Y	A453V	
E58Y	C437M	K374K	A453A	
E135G	C437W	L526E	V409I	
A363L	C437Y	L526Q	V409T	
K374Y	C437C	L526L	K161C	
T381I	M460A	R242G	K161E	
L436L	I447T	R242R	K161N	
H254R	I447V	A443G	K161Q	
H254C	I447Y	A443Q	G99E	
E488C	S444D	A443R	G99G	
E488F	G389E	A443S	S288A	
T383Y	L376I	S13S	S288C	
K414I	L376M	V268I	S288T	
K414R	L376L	V268V	W392I	
K414S	I504F	K161A	W392M	
K414W	I504I	V409V	W392S	
E472C	E467W	D323F	W392T	
E472L	S510C	G99D	W392V	

[00122] A tabela A descreve substituições específicas na isopreno sintase de *P. alba* MEA. Os resíduos correspondentes nas outras isopreno sintases originais podem ser mutados de modo similar para gerar as variantes de isopreno sintase da invenção.

ÁCIDOS NUCLEICOS E POLIPEPTÍDEOS DA ROTA MVA

[00123] A rota MVA completa pode ser subdividida em dois grupos: uma rota superior e uma inferior. Na porção superior da rota de MVA, acetil Co-A produzida durante o metabolismo celular é convertida em mevalonato através das ações de polipeptídeos tendo qualquer de: (a) (i)atividade de tiolase ou (ii) atividade de acetoacetil-CoA sintase, (b) de HMG-CoA redutase, e (c) atividade enzimática de HMG-CoA sintase. Primeiro, acetil Co-A é convertida em acetoacetil CoA através da

ação de uma tiolase ou uma acetoacetil-CoA sintase (que usa acetil-CoA e malonil-CoA). Em seguida, acetoacetil-CoA é convertida em 3-hidróxi-3-metilglutarilCoA (HMG-CoA) pela ação enzimática de HMG-CoA sintase. Este derivado de Co-A é reduzido para mevalonato pela HMG-CoA redutase, que é a etapa limitante de taxa da rota de mevalonato da produção de isoprenoide. Na rota inferior de MVA, o mevalonato é então convertido em mevalonato-5-fosfato através da ação da mevalonato quinase, que é subsequentemente transformada em 5-difosfomevalonato pela atividade enzimática da fosfomevalonato quinase. Finalmente, IPP é formado a partir do 5-difosfomevalonato pela atividade da enzima mevalonato-5-pirofosfato decarboxilase.

[00124] Os polipeptídeos da rota MVA exemplificadores que podem ser usados em conjunto com um gene *ispA* que tem atividade funcional diminuída incluem, mas não se limitam a: Polipeptídeos de 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA sintase (HMG-CoA sintase) (por exemplo, uma enzima codificada por *mvaS*), polipeptídeos de 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA redutase (HMG-CoA redutase) (por exemplo, enzima codificada por *mvaR* ou enzima codificada por *mvaE* que foi modificada para ser deficiente em tiolase, mas ainda retém sua atividade de redutase), polipeptídeos de mevalonato quinase (MVK), polipeptídeos de fosfomevalonato quinase (PMK), polipeptídeos de difosfomevalonato descarboxilase (MVD), polipeptídeos de fosfomevalonato descarboxilase (PMDC), polipeptídeos de isopentenil fosfato quinase (IPK), polipeptídeos de IPP isomerase, polipeptídeos de IDI, e polipeptídeos (por exemplo, polipeptídeos de fusão) que tem uma atividade de dois ou mais polipeptídeos da rota MVA. Em particular, os polipeptídeos da rota de MVA incluem polipeptídeos, fragmentos de polipeptídeos, peptídeos e polipeptídeos de fusão que têm pelo menos uma atividade de um polipeptídeo de rota de MVA. Ácidos nucleicos da rota de MVA exemplificadores incluem ácidos nucleicos que codificam um polipeptí-

deo, fragmento de um polipeptídeo, peptídeo, ou polipeptídeo de fusão que tem pelo menos uma atividade de um polipeptídeo da rota de MVA. Polipeptídeos e ácidos nucleicos da rota de MVA exemplificadores incluem polipeptídeos e ácidos nucleicos de ocorrência natural de qualquer um dos organismos fonte descritos no presente documento. Além disso, as variantes do polipeptídeo da rota de MVA que conferem o resultado de melhor produção de isopreno também podem ser usadas.

[00125] Exemplos não limitadores de polipeptídeos da rota de MVA que podem ser usados são descritos na publicação de pedido de patente internacional n° WO 2009/076676; WO 2010/003007 e WO 2010/148150.

ÁCIDOS NUCLEICOS E POLIPEPTÍDEOS DE ACETOACETIL-COA SINTASE

[00126] O gene de acetoacetil-CoA sintase (também conhecido como *nphT7*) é um gene que codifica uma enzima que tem a atividade de sintetizar acetoacetil-CoA a partir de malonil-CoA e acetil-CoA e que tem atividade mínima (por exemplo, nenhuma atividade) de sintetizar acetoacetil-CoA a partir de duas moléculas de acetil-CoA. Consulte, por exemplo, Okamura et al., 2010, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107(25):11265-11270, cujos conteúdos estão expressamente aqui incorporados para ensinamento sobre nphT7. Um gene de acetoacetil-CoA sintase de uma cepa CL190 de actinomiceto do gênero Streptomyces foi descrito na publicação de patente JP (Kokai) n° 2008-61506 A e publicação de pedido de Patente US 2010/0285549. A acetoacetil-CoA sintase pode também ser chamada de acetil CoA:malonil CoA aciltransferase. Uma acetoacetil-CoA sintase representativa (ou acetil CoA:malonil CoA aciltransferase) que pode ser usada é Genbank AB540131.1.

[00127] Em uma modalidade, a acetoacetil-CoA sintase da presente invenção sintetiza acetoacetil-CoA a partir de malonil-CoA e acetil-CoA

através de uma reação irreversível. O uso de acetoacetil-CoA sintase para gerar acetil-CoA fornece uma vantagem adicional na medida em que esta reação é irreversível enquanto que a ação da enzima acetoacetil-CoA tiolase de sintetização de acetoacetil-CoA a partir de duas moléculas de acetil-CoA é reversível. Consequentemente, o uso de acetoacetil-CoA sintase para sintetizar acetoacetil-CoA a partir de malonil-CoA e acetil-CoA pode resultar em aprimoramento significativo na produtividade de isopreno em comparação com o uso de tiolase para gerar o mesmo produto final.

[00128] Além disso, o uso de acetoacetil -CoA sintase para produzir o isopreno fornece uma outra vantagem na medida em que acetoacetil-CoA sintase pode converter malonil CoA em acetil CoA através da descarboxilação da CoA. Dessa forma, os armazenamentos do substrato de partida não estão limitados pelas quantidades de partida de acetil CoA. A síntese de acetoacetil-CoA por acetoacetil-CoA sintase pode ainda ocorrer quando o substrato de partida é apenas malonil-CoA. Em uma modalidade, o pool (grupo) de partida de malonil-CoA é aumentado com o uso de cepas hospedeiras que têm mais malonil-CoA. Esse aumento do pool pode ser de ocorrência natural ou ser manipulado por manipulação molecular. Consulte, por exemplo, Fowler, *et. al*, 2009, *Applied and Environmental Microbiology*, 75(18):5831-5839.

[00129] Em qualquer um dos aspectos ou modalidades aqui descritos, uma enzima que tem a capacidade de sintetizar acetoacetil-CoA a partir de malonil-CoA e acetil-CoA pode ser usada. Exemplos não limitadores de uma tal enzima são descritos na presente invenção. Em determinadas modalidades aqui descritas, um gene de acetoacetil-CoA sintase derivado de um actinomiceto do gênero Streptomyces que tem a atividade de sintetizar acetoacetil-CoA a partir de malonil-CoA e acetil-CoA pode ser usado.

[00130] Um exemplo de um tal gene da acetoacetil-CoA sintase é o

gene que codifica uma proteína tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1. Esta proteína que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1 corresponde a uma acetoacetil-CoA sintase que tem atividade de sintetização de acetoacetil-CoA a partir de malonil-CoA e acetil-CoA e que não tem nenhuma atividade de sintetização de acetoacetil-CoA a partir de duas moléculas de acetil-CoA.

[00131] Em uma modalidade, o gene que codifica uma proteína tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1 pode ser obtido através de um método de amplificação do ácido nucleico (por exemplo, PCR) com o uso de DNA genômico obtido a partir de um actinomiceto da cepa de Streptomyces sp. CL190 como um molde e um par de iniciadores que pode ser projetado com referência à publicação de patente japonesa (Kokai) n°2008-61506 A.

[00132] Conforme descrito aqui, um gene da acetoacetil-CoA sintase para uso na presente invenção não se limita a um gene que codifica uma proteína tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1 a partir de um actinomiceto da cepa de Streptomyces sp. CL190. Qualquer gene que codifica uma proteína tendo a capacidade de sintetizar a acetoacetil-CoA a partir de malonil-CoA e acetil-CoA, e que não sintetiza acetoacetil-CoA a partir de duas moléculas de acetil-CoA pode ser usada nos métodos presentemente descritos. Em certas modalidades, o gene da acetoacetil-CoA- sintase pode ser um gene que codifica uma proteína tendo uma sequência de aminoácidos com elevada similaridade ou substancialmente idêntica à sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1 e tendo a função de sintetizar a acetoacetil-CoA a partir de malonil-CoA e acetil-CoA. A expressão "altamente similar" ou "substancialmente idêntica" refere-se a, por exemplo, pelo menos cerca de 80% de identidade, pelo menos cerca de 85%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 91%, pelo menos cerca de 92%, pelo menos cerca de 93%, pelo menos cerca de 94%, pelo menos cerca de

95%, pelo menos cerca de 96%, pelo menos cerca de 97%, pelo menos cerca de 98%, e pelo menos cerca de 99% de identidade. Como usado acima, o valor de identidade corresponde à porcentagem de identidade entre os resíduos de aminoácidos em uma sequência de aminoácidos diferente e a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1, que é calculada através da realização de alinhamento da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1 e da sequência de aminoácidos diferente com o uso de um programa de busca de similaridade de sequência.

[00133] Em outras modalidades, o gene de acetoacetil-CoA sintase pode ser um gene que codifica uma proteína tendo uma sequência de aminoácidos derivada da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1 mediante a substituição, deleção, adição ou inserção de um ou mais aminoácidos e tendo a função de sintetizar acetoacetil-CoA a partir de malonil-CoA e acetil-CoA. Na presente invenção, a expressão "mais aminoácidos" refere-se a, por exemplo, 2 a 30 aminoácidos, de preferência, 2 a 20 aminoácidos, com mais preferência, 2 a 10 aminoácidos e, com a máxima preferência, 2 a 5 aminoácidos.

[00134] Em ainda outras modalidades, o gene da acetoacetil-CoA sintase pode consistir em um polinucleotídeo capaz de se hibridizar com uma porção ou a totalidade de um polinucleotídeo que tem uma sequência de nucleotídeos complementar à sequência de nucleotídeos que codifica a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1 sob condições estringentes e capaz de codificar uma proteína que tem a função de sintetizar a acetoacetil-CoA a partir de malonil-CoA e acetil-CoA. Na presente invenção, a hibridização sob condições estringentes corresponde à manutenção da ligação sob condições de lavagem a 60 ℃ em SSC 2X. A hibridização pode ser realizada por métodos convencionalmente conhecidos como o método descrito em J. Sambrook et al. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3° Ed., Col d Spring Harbor Laboratory (2001).

[00135] Conforme descrito aqui, um gene que codifica uma acetoacetil-CoA sintase, tendo uma sequência de aminoácidos que difere da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1 pode ser isolado potencialmente a partir de qualquer organismo, por exemplo, de um actinomiceto, que não é obtido a partir da cepa de Streptomyces sp. CL190. Além disso, os genes de acetoacetil-CoA sintase para uso na presente invenção podem ser obtidos mediante a modificação de um polinucleotídeo que codifica a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1 por um método conhecido na técnica. A mutagênese de uma sequência de nucleotídeos pode ser realizada por um método conhecido como o método de Kunkel ou o método bidirecional com intervalos ou por um método semelhante a um dos mesmos. Por exemplo, a mutagênese pode ser realizada com o uso de um kit de mutagênese (por exemplo, nomes de produtos; Mutant-K e Mutant-G (TAKARA Bio)) para a mutagênese sítio-específica, nome do produto; um kit da série de Mutagênese in vitro LA PCR, e similares.

[00136] A atividade de uma acetoacetil-CoA sintase tendo uma sequência de aminoácidos que difere da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1 pode ser avaliada, como descrito abaixo. Especificamente, um gene que codifica uma proteína a ser avaliada é primeiramente introduzido em uma célula hospedeira, de modo que o gene possa ser expresso na mesma, seguido de purificação da proteína através de uma técnica tal como cromatografia. A malonil-CoA e acetil-CoA são adicionadas como substratos a um tampão contendo a proteína obtida para ser avaliada, seguido, por exemplo, de incubação a uma temperatura desejada (por exemplo, 10℃ a 60℃) . Após a conclusão da reação, a quantidade de substrato perdido e/ou a quantidade de produto (acetoacetil-CoA) produzido são determinadas. Dessa forma, é possível avaliar se a proteína sendo ou não testada tem a função de sintetizar a acetoacetil-CoA a partir de malonil-CoA e acetil-

CoA, e avaliar o grau de síntese. Neste caso, é possível examinar determinar s a proteína tem ou não atividade de sintetizar a acetoacetil-CoA a partir de duas moléculas de acetil-CoA mediante a adição de acetil-CoA sozinha como um substrato a um tampão contendo a proteína obtida a ser avaliada e determinação da quantidade de substrato perdido e/ou a quantidade de produto produzido de um modo semelhante.

ÁCIDOS NUCLEICOS QUE CODIFICAM POLIPEPTÍDEOS DA ROTA DE MVA SUPERIOR

[00137] A porção superior da rota de MVA usa acetil Co-A produzida durante o metabolismo celular como o substrato inicial para a conversão em mevalonato através das ações de polipeptídeos tendo qualquer de: (a) (i) atividade de tiolase ou (ii) atividade de acetoacetil-CoA, (b) de HMG-CoA redutase, e (c) atividade enzimática de HMG-CoA sintase. Primeiro, acetil Co-A é convertida em acetoacetil CoA através da ação de uma tiolase ou uma acetoacetil-CoA sintase (que usa acetil-CoA e malonil-CoA). Em seguida, a acetoacetil-CoA é convertida em 3-hidróxi-3-metilglutarilCoA (HMG-CoA) pela ação enzimática de HMG-CoA sintase. Este derivado de Co-A é reduzido para mevalonato pela HMG-CoA redutase, que é a etapa limitante de taxa da rota de mevalonato da produção de isoprenoide.

[00138] Exemplos não limitadores de polipeptídeos da rota superior de MVA que podem ser usados em conjunto com um gene *ispA* que tem atividade funcional diminuída incluem: polipeptídeos de acetil-CoA acetiltransferase (AA-CoA tiolase), polipeptídeos de acetoacetil-CoA sintase, polipeptídeos de 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA sintase (HMG-CoA sintase), polipeptídeos de 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA redutase (HMG-CoA redutase). Os polipeptídeos da rota de MVA superior podem incluir polipeptídeos, fragmentos de polipeptídeos, peptídeos e polipeptídeos de fusão que têm pelo menos uma atividade de um poli-

peptídeo da rota de MVA superior. Ácidos nucleicos da rota de MVA superior exemplificadores incluem ácidos nucleicos que codificam um polipeptídeo, fragmento de um polipeptídeo, peptídeo, ou polipeptídeo de fusão que tem pelo menos uma atividade de um polipeptídeo da rota de MVA superior. Polipeptídeos e ácidos nucleicos da rota de MVA exemplificadores incluem polipeptídeos e ácidos nucleicos de ocorrência natural de qualquer um dos organismos fonte descritos no presente documento. Dessa forma, é contemplado aqui que qualquer gene que codifica um polipeptídeo da rota de MVA superior pode ser usado na presente invenção.

[00139] Em certas modalidades, várias opções de genes *mvaE* e *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* e/ou *E. faecalis* sozinhos ou em combinação com um ou mais outros genes *mvaE* e *mvaS* que codificam proteínas da rota de MVA superior são contemplados dentro do escopo da invenção. Em outras modalidades, um gene de acetoacetil-CoA sintase é contemplado dentro do escopo da presente invenção em combinação com um ou mais outros genes que codificam: (i) polipeptídeos de 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA sintase (HMG-CoA sintase) e polipeptídeos de 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA redutase (HMG-CoA redutase). Desta forma, em determinados aspectos, qualquer uma das combinações de genes contempladas pode ser expressa em células recombinantes em conjunto com um gene *ispA* que tem atividade funcional diminuída em qualquer uma das formas aqui descritas.

[00140] Alguns exemplos não limitadores adicionais de polipeptídeos da rota de MVA superior que podem ser usados aqui são descritos nas publicações de pedidos de patente internacionais nºs WO 2009/076676; WO 2010/003007 e WO 2010/148150.

GENES QUE CODIFICAM POLIPEPTÍDEOS DE MVAE E MVAS

[00141] Em certas modalidades, várias opções de genes *mvaE* e

mvaS (como, mas não se limitando a, genes *mvaE* e *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, e/ou *E. faecalis*) sozinhos ou em combinação com um ou mais outros genes *mvaE* e *mvaS* que codificam proteínas da rota de MVA superior são contemplados dentro do escopo da invenção em conjunto com um IspA que tem atividade funcional diminuída em células recombinantes. Em muitos organismos (por exemplo, *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, e *E. faecalis*), o gene *mvaE* codifica um polipeptídeo que possui tanto atividade de tiolase quanto HMG-CoA redutase (Hedl, *et al.*, abril de 2002, *J Bacteriol.* 184(8): 2116–2122). O gene *mvaS*, por outro lado, codifica um polipeptídeo que tem uma atividade de HMG-CoA sintase.

[00142] Consequentemente, células recombinantes (por exemplo, *E. coli*) podem ser manipuladas para expressar um ou mais genes *mvaE* e *mvaS* (por exemplo, mas não se limitando aos genes *mvaE* e *mvaS* de *L. grayi*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* e/ou *E. faecalis*), para produzir isopreno em conjunto com um gene *ispA* que tem atividade funcional diminuída. O um ou mais genes *mvaE* e *mvaS* pode ser expresso em um plasmídeo multicópia. O plasmídeo pode ser um plasmídeo com alto número de cópias, um plasmídeo com baixa número de cópias, ou um plasmídeo com número média de cópias. Alternativamente, o um ou mais genes *mvaE* e *mvaS* podem ser integrados em um cromossomo da célula hospedeira. Para ambas as expressões heterólogas do um ou mais genes *mvaE* e *mvaS* em um plasmídeo ou como uma parte integrada do cromossomo da célula hospedeira, a expressão dos genes pode ser acionada por qualquer um dentre o promotor induzível ou um promotor de expressão constitutiva. O promotor pode ser um acionador forte da expressão, ele pode ser um acionador fraco de expressão, ou ele pode ser um acionador médio de expressão do um ou mais genes *mvaE* e *mvaS*.

[00143] O gene *mvaE* codifica um polipeptídeo que possui ambas

as atividades de tiolase e de HMG-CoA redutase. A atividade de tiolase do polipeptídeo codificado pelo gene *mvaE* converte acetil Co-A em acetoacetil CoA ao passo que a atividade enzimática da HMG-CoA redutase do polipeptídeo converte 3-hidróxi-3-metil glutaril-CoA em mevalonato. Os ácidos nucleicos e polipeptídeos de mvaE exemplificadores incluem polipeptídeos e ácidos nucleicos que ocorrem naturalmente a partir de qualquer um dos organismos fonte aqui descritos, bem como polipeptídeos e ácidos nucleicos mutantes derivados de qualquer um dos organismos fonte aqui descritos que têm pelo menos uma atividade de um polipeptídeo de mvaE.

[00144] Os polipeptídeos de mvaE mutantes incluem aqueles nos quais um ou mais resíduos de aminoácidos foram sujeitos à substituição de aminoácido, enquanto retêm a atividade do polipeptídeo de mvaE (isto é, a capacidade de converter acetil Co-A em acetoacetil CoA bem como a capacidade de converter 3-hidróxi-3-metil glutaril-CoA em mevalonato). As substituições de aminoácido podem ser conservativas ou não conservativas e tais resíduos de aminoácidos substituídos podem ou não ser um codificado pelo código genético. O "alfabeto" padrão de vinte aminoácidos foi dividido em famílias químicas com base na similaridade de suas cadeias laterais. Essas famílias incluem aminoácidos com cadeias laterais básicas (por exemplo lisina, arginina, histidina), cadeias laterais ácidas (por exemplo ácido aspártico, ácido glutâmico), cadeias laterais polares não carregadas (por exemplo glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadeias laterais não polares (por exemplo alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano), cadeias laterais beta-ramificadas (por exemplo treonina, valina, isoleucina) e cadeias laterais aromáticas (por exemplo tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina). Uma "substituição de aminoácido conservativa" é aquela na qual o resíduo de aminoácido é substituído por um resíduo de aminoácido

que tem uma cadeia lateral quimicamente similar (isto é, substituir um aminoácido que tem uma cadeia lateral básica por outro aminoácido que tem uma cadeia lateral básica). Uma "substituição de aminoácido não conservativa" é aquela na qual o resíduo de aminoácido é substituído por um resíduo de aminoácido que tem uma cadeia lateral quimicamente diferente (isto é, substituir um aminoácido que tem uma cadeia lateral básica por outro aminoácido que tem uma cadeia lateral aromática).

[00145] As substituições de aminoácido no polipeptídeo de mvaE podem ser introduzidas para otimizar a funcionalidade da molécula. Por exemplo, as substituições de aminoácido que aumentam a afinidade de ligação do polipeptídeo de mvaE pelo seu substrato, ou que otimizam sua capacidade para converter acetil Co-A em acetoacetil CoA e/ou a capacidade para converter 3-hidróxi-3-metil glutaril-CoA em mevalonato podem ser introduzidas no polipeptídeo de mvaE. Em alguns aspectos, os polipeptídeos de mvaE mutantes contêm uma ou mais substituições conservativas de aminoácidos.

[00146] Em um aspecto, as proteínas de mvaE que não são degradadas ou são menos propensas à degradação podem ser usadas para a produção de isopreno. Exemplos de produtos gênicos de *mvaEs* que não são degradados ou são menos propensos à degradação que podem ser usados incluem, mas não se limitam a, aqueles dos organismos *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. faecalis*, e *L. grayi*. Um profissional versado na técnica pode expressar a proteína de mvaE em *E. coli* BL21 (DE3) procurar a ausência dos fragmentos através de quaisquer técnicas padrões de biologia molecular. Por exemplo, a ausência de fragmentos pode ser identificada em géis de SDS-PAGE corados com SafeStain após purificação mediada por His ou quando expressos em mevalonato, isopreno ou isoprenoide produzindo *E. coli* BL21 com o uso de métodos de detecção aqui descritos.

[00147] Métodos-padrão, como aqueles descritos em Hedl et al., (Hedl, *et al.*, *J Bacteriol.* abril de 2002, 184(8): 2116–2122) podem ser usados para determinar se um polipeptídeo tem atividade mvaE, medindo-se a atividade de acetoacetil-CoA tiolase bem como HMG-CoA redutase. Em um ensaio exemplificador, a atividade de acetoacetil-CoA tiolase é medida pelo espectrofotômetro para monitorar a alteração na absorbância a 302 nm que acompanha a formação ou tiólise de acetoacetil-CoA. As condições padrão de ensaio para cada reação para determinar a síntese de acetoacetil-CoA redutase, são acetil-CoA 1 mM, $MgCl_2$ 10 mM, Tris 50 mM, pH 10,5 e a reação é iniciada pela adição de enzima. Os ensaios podem empregar um volume final de 200 µl. Para o ensaio, 1 unidade de enzima (U) representa a síntese ou tiólise em 1 min de 1 µmol de acetoacetil-CoA. Em um outro ensaio exemplificador, a atividade da HMG-CoA redutase pode ser monitorada por espectrofotometria pelo aparecimento ou desaparecimento de NADP(H) a 340 nm. As condições padrão de ensaio para cada reação medidas para mostrar a desacilação redutiva de HMG-CoA para mevalonato são NADPH 0,4 mM, (*R*,*S*)-HMG-CoA 1,0 mM, KCl 100 mM, e $K_xPO_4$100 mM, pH 6,5. Os ensaios empregam um volume final de 200 µl. As reações são iniciadas pela adição da enzima. Para o ensaio, 1 U representa o volume, em 1 minuto, de 1 µmol de NADP(H). Isso corresponde ao volume de 0,5 µmol de HMG-CoA ou mevalonato.

[00148] Os ácidos nucleicos de mvaE exemplificadores incluem ácidos nucleicos que codificam um polipeptídeo, o fragmento de um polipeptídeo, peptídeo, ou polipeptídeo de fusão, que tem pelo menos uma atividade de um polipeptídeo de mvaE. Os ácidos nucleicos e polipeptídeos de mvaE exemplificadores incluem polipeptídeos e ácidos nucleicos de ocorrência natural de qualquer um dos organismos fonte descritos no presente documento, assim como ácidos nucleicos e polipeptídeos mutantes derivados de qualquer um dos organismos fonte

descritos na presente invenção. Ácidos nucleicos de mvaE exemplificadores incluem, por exemplo, ácidos nucleicos de mvaE isolados de *Listeria grayi_DSM 20601*, Enterococcus *faecium*, *Enterococcus gallinarum EG2*, *Enterococcus faecalis*, e/ou *Enterococcus casseliflavus*. O ácido nucleico de mvaE codificado pelo gene de *DSM_20601 mvaE* de *Listeria grayi* pode ter 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 95%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89%, 88%, 87%, 86%, ou 85% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 2. O ácido nucleico de mvaE codificado pelo gene *mvaE* de *Enterococcus faecium* pode ter 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 95%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89%, 88%, 87%, 86%, ou 85% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 3. O ácido nucleico de mvaE codificado pelo gene *EG2 mvaE* de *Enterococcus gallinarum* pode ter 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 95%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89%, 88%, 87%, 86%, ou 85% de identidade de sequência com a SEQ ID NO:4. O ácido nucleico de mvaE codificado pelo gene *mvaE* de *Enterococcus casseliflavus* pode ter 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 95%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89%, 88%, 87%, 86%, ou 85% de identidade de sequência com a SEQ ID NO:5. O ácido nucleico de mvaE codificado pelo gene *mvaE* de *Enterococcus faecalis* pode ter 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 95%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89%, 88%, 87%, 86%, ou 85% de identidade com o gene *mvaE* anteriormente apresentado em *E. coli* para produzir mevalonato (consulte US 2005/0287655 A1; Tabata, K. e Hashimoto, S.-I. 2004, *Biotechnology Letters* 26:1487–1491).

[00149] O ácido nucleico de mvaE pode ser expresso em uma célula recombinante em um plasmídeo multicópias. O plasmídeo pode ser um plasmídeo com alto número de cópias, um plasmídeo com baixa número de cópias, ou um plasmídeo com número média de cópias. Alternativamente, o ácido nucleico de mvaE pode ser integrado no cromossomo da célula hospedeira. Para ambas as expressões heterólogas de um ácido nucleico de mavE em um plasmídeo ou como uma

parte integrada do cromossomo da célula hospedeira, a expressão de ácido nucleico pode ser acionada por qualquer um dentre o promotor induzível ou um promotor de expressão constitutiva. O promotor pode ser um acionador forte da expressão, ele pode ser um acionador fraco de expressão, ou ele pode ser um acionador médio de expressão do ácido nucleico de mvaE.

[00150] O gene *mvaS* codifica um polipeptídeo que possui atividade de HMG-CoA sintase. Este polipeptídeo pode converter acetoacetil CoA em 3-hidróxi-3-metil glutaril-CoA (HMG-CoA). Os polipeptídeos e ácidos nucleicos de mvaS exemplificadores incluem polipeptídeos e ácidos nucleicos de ocorrência natural de qualquer um dos organismos fonte descritos no presente documento, bem como polipeptídeos e ácidos nucleicos mutantes derivados de qualquer um dos organismos fonte descritos no presente documento, que têm pelo menos uma atividade de um polipeptídeo de mvaS.

[00151] Os polipeptídeos de mvaS mutantes incluem aqueles nos quais um ou mais resíduos de aminoácidos foram sujeitos a uma substituição de aminoácido enquanto retêm a atividade do mvaS polipeptídeo (isto é, a capacidade de converter acetoacetil CoA em 3-hidróxi-3-metil glutaril-CoA). As substituições de aminoácido no polipeptídeo de mvaS podem ser introduzidas para otimizar a funcionalidade da molécula. Por exemplo, as substituições de aminoácido que aumentam a afinidade de ligação do polipeptídeo de mvaS para seu substrato, ou que otimizam sua capacidade para converter acetoacetil CoA em 3-hidróxi-3-metil glutaril-CoA podem ser introduzidas no polipeptídeo de mvaS. Em alguns aspectos, os polipeptídeos de mvaS mutantes contém uma ou mais substituições conservativas de aminoácidos.

[00152] Os métodos-padrão, como aqueles descritos em Quant et al.(1989, *Biochem J.*, 262:159-164), podem ser usados para determinar se um polipeptídeo tem atividade de mvaS, mediante a medição da

atividade de HMG-CoA sintase. Em um ensaio exemplificador, a atividade de HMG-CoA sintase pode ser testada medindo-se espectrofotometricamente o desaparecimento da forma enólica de acetoacetil-CoA mediante o monitoramento da alteração da absorbância a 303 nm. Um sistema de ensaio padrão de 1 ml contendo Tris/HC 50 mM, pH 8,0, MgCl2 10 mM e ditiotreitol 0,2 mM a 30 ℃; ace til fosfato 5 mM, acetoacetil-CoA 10 mM e amostras de 5 µl de extratos pode ser adicionado, seguido de adição simultânea de acetil-CoA (100 µM) e 10 unidades de PTA. A atividade de HMG-CoA sintase é então medida como a diferença na taxa antes e depois da adição de acetil-CoA. O coeficiente de absorção de acetoacetil-CoA sob as condições usadas (pH 8,0, $MgCl_2$ 10 mM), é 12,2 x 10^3 M^{-1} cm^{-1}. Por definição, 1 unidade de atividade de enzima faz com que 1 µmol de acetoacetil-CoA seja transformado por minuto.

[00153] Os ácidos nucleicos de mvaS exemplificadores incluem os ácidos nucleicos que codificam um polipeptídeo, fragmento de um polipeptídeo, peptídeo, ou polipeptídeo de fusão que tem pelo menos uma atividade de um polipeptídeo de mvaS. Os polipeptídeos e ácidos nucleicos de mvaS exemplificadores incluem polipeptídeos e ácidos nucleicos de ocorrência natural de qualquer um dos organismos fonte descritos no presente documento, bem como polipeptídeos e ácidos nucleicos mutantes derivados de qualquer um dos organismos fonte descritos no presente documento. Ácidos nucleicos de mvaS exemplificadores incluem, por exemplo, ácidos nucleicos de mvaS isolados de *Listeria grayi_DSM 20601*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus gallinarum EG2*, *Enterococcus faecalis*, e/ou *Enterococcus casseliflavus*. O ácido nucleico de mvaS codificado pelo gene *DSM_20601 mvaS* de *Listeria grayi* pode ter 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 95%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89%, 88%, 87%, 86%, ou 85% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 6. O ácido nucleico de mvaS codificado pelo gene

mvaS de *Enterococcus faecium* pode ter 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 95%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89%, 88%, 87%, 86%, ou 85% de identidade de sequência com a SEQ ID NO:7. O ácido nucleico de mvaS codificado pelo gene *EG2 mvaS* de *Enterococcus gallinarum* pode ter 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 95%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89%, 88%, 87%, 86%, ou 85% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 8. O ácido nucleico de mvaS codificado pelo gene *mvaS* de *Enterococcus casseliflavus* pode ter 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 95%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89%, 88%, 87%, 86%, ou 85% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 9. O ácido nucleico de mvaS codificado pelo gene *mvaS* de *Enterococcus faecalis* pode ter 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 95%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89%, 88%, 87%, 86%, ou 85% de identidade de sequência com o gene *mvaE* anteriormente apresentado em *E. coli* para produzir mevalonato (consulte US 2005/0287655 A1; Tabata, K. e Hashimoto, S.-I. 2004, *Biotechnology Letters* 26:1487–1491).

[00154] O ácido nucleico de mvaS pode ser expresso em uma célula recombinante em um plasmídeo multicópias. O plasmídeo pode ser um plasmídeo com alto número de cópias, um plasmídeo com baixa número de cópias, ou um plasmídeo com número média de cópias. Alternativamente, o ácido nucleico de mvaS pode ser integrado no cromossomo da célula hospedeira. Para ambas as expressões heterólogas de um ácido nucleico de mvaS em um plasmídeo ou como uma parte integrada do cromossomo da célula hospedeira, a expressão de ácido nucleico pode ser acionada por qualquer um dentre o promotor induzível ou um promotor de expressão constitutiva. O promotor pode ser um acionador forte da expressão, ele pode ser um acionador fraco de expressão, ou ele pode ser um acionador médio de expressão do ácido nucleico de mvaS.

[00155] As composições de células recombinantes aqui descritas

também estão contempladas dentro do escopo da invenção. Entende-se que células recombinantes também abrangem células de progênie.

ÁCIDOS NUCLEICOS QUE CODIFICAM POLIPEPTÍDEOS DA ROTA DE MVA INFERIOR

[00156] Em alguns aspectos da invenção, as células descritas em qualquer uma das composições ou métodos aqui descritos compreendem, ainda, um ou mais ácidos nucleicos que codificam um polipeptídeo(s) da rota de mevalonato (MVA) inferior. Em alguns aspectos, o polipeptídeo da rota de MVA inferior é um polipeptídeo endógeno. Em alguns aspectos, o ácido nucleico endógeno que codifica um polipeptídeo da rota de MVA inferior está ligado de maneira funcional a um promotor constitutivo. Em alguns aspectos, o ácido nucleico endógeno que codifica um polipeptídeo da rota de MVA inferior está ligado de maneira funcional a um promotor induzível. Em alguns aspectos, o ácido nucleico endógeno que codifica um polipeptídeo da rota de MVA inferior está ligado de maneira funcional a um promotor forte. Em um aspecto particular, as células são manipuladas para superexpressar o polipeptídeo endógeno da rota de MVA inferior em relação às células do tipo selvagem. Em alguns aspectos, o ácido nucleico endógeno que codifica um polipeptídeo da rota de MVA inferior está ligado de maneira funcional a um promotor fraco.

[00157] A rota biossintética de mevalonato inferior compreende mevalonato quinase (MVK), fosfomevalonato quinase (PMK), e difosfomevalonato decarboxilase (MVD). Em alguns aspectos, a rota de MVA inferior pode compreender adicionalmente isopentenil difosfato isomerase (IDI). As células fornecidas aqui compreendem pelo menos um ácido nucleico que codifica isopreno sintase, um ou mais polipeptídeos da rota de MVA superior, e/ou um ou mais polipeptídeos da rota de MVA inferior. Os polipeptídeos da rota de MVA inferior podem ser qualquer enzima (a) que fosforila mevalonato em mevalonato 5-fosfato;

(b) que converte mevalonato 5-fosfato em mevalonato 5-pirofosfato; e (c) que converte mevalonato 5-pirofosfato em pirofosfato de isopentenila. Mais particularmente, a enzima que fosforila mevalonato em mevalonato 5-fosfato pode ser do grupo que consiste em mevalonato quinase de *M. mazei*, mevalonato quinase de *M. burtonii*, polipeptídeo de mevalonato quinase de *Lactobacillus*, polipeptídeo de mevalonato quinase de *Lactobacillus sakei*, polipeptídeo de mevalonato quinase de levedura, polipeptídeo de mevalonato quinase de *Saccharomyces cerevisiae*, polipeptídeo de mevalonato quinase de *Streptococcus*, polipeptídeo de mevalonato quinase *Streptococcus pneumoniae*, polipeptídeo de mevalonato quinase de *Streptomyces*, e polipeptídeo de mevalonato quinase de *Streptomyces CL190*. Em um outro aspecto, a enzima que fosforila mevalonato em mevalonato 5-fosfato é mevalonato quinase de *M. mazei*.

[00158] Em alguns aspectos, o polipeptídeo da rota de MVA inferior é um polipeptídeo heterólogo. Em alguns aspectos, as células compreendem mais do que uma cópia de um ácido nucleico heterólogo que codifica um polipeptídeo da rota de MVA inferior. Em alguns aspectos, o ácido nucleico heterólogo que codifica um polipeptídeo da rota de MVA inferior está ligado de maneira funcional a um promotor constitutivo. Em alguns aspectos, o ácido nucleico heterólogo que codifica um polipeptídeo da rota de MVA inferior está ligado de maneira funcional a um promotor induzível. Em alguns aspectos, o ácido nucleico heterólogo que codifica um polipeptídeo da rota de MVA inferior está ligado de maneira funcional a um promotor forte. Em alguns aspectos, o ácido nucleico heterólogo que codifica um polipeptídeo da rota de MVA inferior está ligado de maneira funcional a um promotor fraco. Em alguns aspectos, o polipeptídeo heterólogo rota de MVA inferior é um polipeptídeo de *Saccharomyces cerevisiae*, *Enterococcus faecalis*, *Methanococcoides burtonii*, ou *Methanosarcina mazei*.

[00159] Os ácidos nucleicos que codificam um polipeptídeo(s) da rota de MVA inferior podem ser integrados em um genoma das células hospedeiras ou podem ser expressos de maneira estável nas células. Os ácidos nucleicos que codificam um polipeptídeo(s) da rota de MVA inferior podem adicionalmente estar em um vetor.

[00160] Polipeptídeos da rota de MVA inferior exemplificadores são também fornecidos abaixo: (i) mevalonato quinase (MVK), (ii) fosfomevalonato quinase (PMK), (iii) difosfomevalonato descarboxilase (MVD), e (iv) isopentenil difosfato isomerase (IDI). Em particular, o polipeptídeo de MVK inferior pode ser do gênero *Methanosarcina* e, mais especificamente, o polipeptídeo de MVK inferior pode ser de *Methanosarcina mazei*. Adicionalmente, o polipeptídeo de MVK inferior pode ser do gênero *Methanococcoides*, e, mais especificamente, pode ser de *M. Burtonii*. Exemplos adicionais de polipeptídeos da rota inferior de MVA podem ser encontrados na publicação de pedido de patente US 2010/0086978, cujos conteúdos estão expressamente aqui incorporados, a título de referência nas suas totalidades no que diz respeito aos polipeptídeos da rota de MVK inferior e variantes de polipeptídeos da rota de MVK inferior.

[00161] Qualquer uma das células descritas aqui pode compreender ácido nucleico(s) de IDI (por exemplo, ácido(s) nucleico(s) endógeno ou heterólogo que codifica IDI). Os polipeptídeos de isopentenil difosfato isomerase (isopentenil-difosfato delta-isomerase ou IDI) catalisam a interconversão do difosfato de isopentenila (IPP) e difosfato de dimetilalila (DMAPP) (por exemplo, convertendo IPP em DMAPP e/ou convertendo DMAPP em IPP). Os polipeptídeos de IDI exemplificadores incluem polipeptídeos, fragmentos de polipeptídeos, peptídeos e polipeptídeos de fusão que têm pelo menos uma atividade de um polipeptídeo de IDI. Métodos-padrão (como aqueles aqui descritos) podem ser usados para determinar se um polipeptídeo tem atividade de

polipeptídeo de IDI mediante a medição da capacidade do dito polipeptídeo para interconverter IPP e DMAPP *in vitro*, em um extrato celular ou *in vivo*. Ácidos nucleicos de IDI exemplificadores incluem ácidos nucleicos que codificam um polipeptídeo, fragmento de um polipeptídeo, peptídeo, ou polipeptídeo de fusão que tenha pelo menos uma atividade de um polipeptídeo de IDI. Polipeptídeos e ácidos nucleicos de IDI exemplificadores incluem polipeptídeos e ácidos nucleicos de ocorrência natural de qualquer um dos organismos fonte descritos no presente documento, assim como ácidos nucleicos e polipeptídeos mutantes derivados de qualquer um dos organismos fonte descritos na presente invenção.

[00162] Os polipeptídeos da rota de MVA inferior incluem polipeptídeos, fragmentos de polipeptídeos, peptídeos, e polipeptídeos de fusão que têm pelo menos uma atividade de um polipeptídeo da rota de MVA inferior. Ácidos nucleicos da rota de MVA inferior exemplificadores incluem os ácidos nucleicos que codificam um polipeptídeo, fragmento de um polipeptídeo, peptídeo, ou polipeptídeo de fusão que tem pelo menos uma atividade de um polipeptídeo da rota de MVA inferior. Polipeptídeos e ácidos nucleicos da rota de MVA inferior exemplificadores incluem polipeptídeos e ácidos nucleicos de ocorrência natural de qualquer um dos organismos fonte descritos no presente documento. Além disso, variantes de polipeptídeos da rota de MVA inferior que conferem o resultado de melhor produção de isopreno também podem ser usadas.

[00163] Em alguns aspectos, o polipeptídeo da rota inferior de MVA é um polipeptídeo de *Saccharomyces cerevisiae*, *Enterococcus faecalis*, *Methanococcoides burtonii*, ou *Methanosarcina mazei*. Em alguns aspectos, o polipeptídeo de MVK é selecionado do grupo que consiste em polipeptídeo de mevalonato quinase *Lactobacillus*, polipeptídeo de mevalonato quinase de *Lactobacillus sakei*, polipeptídeo de mevalona-

to quinase de levedura, polipeptídeo de mevalonato quinase de *Saccharomyces cerevisiae*, polipeptídeo de mevalonato quinase de *Streptococcus*, polipeptídeo de mevalonato quinase de *Streptococcus pneumoniae*, polipeptídeo de mevalonato quinase de *Streptomyces*, polipeptídeo de mevalonato quinase de *Streptomyces* CL190, e polipeptídeo de mevalonato quinase de *Methanosarcina mazei*. Qualquer um dos promotores descritos aqui (por exemplo, promotores descritos aqui e identificados nos Exemplos da presente descrição, incluindo promotores induzíveis e promotores constitutivos) podem ser usados para direcionar a expressão de qualquer um dos polipeptídeos de MVA aqui descritos.

ÁCIDOS NUCLEICOS E POLIPEPTÍDEOS DA ROTA DXP

[00164] Em alguns aspectos da invenção, as células recombinantes descritas em qualquer uma das composições ou métodos descritos aqui compreendem adicionalmente um ou mais ácidos nucleicos heterólogos que codificam um polipeptídeo de DXS ou outros polipeptídeos da rota de DXP. Em alguns aspectos, as células compreendem adicionalmente uma cópia cromossômica de um ácido nucleico endógeno que codifica um polipeptídeo de DXS ou outros polipeptídeos da rota de DXP. Em alguns aspectos, as células de *E. coli* compreendem, adicionalmente, um ou mais ácidos nucleicos que codificam um polipeptídeo de IDI e um polipeptídeo de DXS ou outros polipeptídeos da rota de DXP. Em alguns aspectos, um ácido nucleico codifica o polipeptídeo de isopreno sintase, o polipeptídeo de IDI e o polipeptídeo de DXS ou outros polipeptídeos da rota de DXP. Em alguns aspectos, um plasmídeo codifica o polipeptídeo de isopreno sintase, o polipeptídeo de IDI e o polipeptídeo de DXS ou outros polipeptídeos da rota de DXP. Em alguns aspectos, múltiplos plasmídeos codificam o polipeptídeo de isopreno sintase, o polipeptídeo de IDI e o polipeptídeo de DXS ou outros polipeptídeos da rota de DXP.

[00165] Os polipeptídeos de DXS exemplificadores incluem polipeptídeos, fragmentos de polipeptídeos, peptídeos e polipeptídeos de fusão que têm pelo menos uma atividade de um polipeptídeo de DXS. Métodos-padrão (como os aqui descritos) podem ser usados para determinar se um polipeptídeo tem atividade de polipeptídeo de DXS mediante a medição da capacidade do polipeptídeo para converter piruvato e D-gliceraldeído-3-fosfato em 1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato *in vitro*, em um extrato celular, ou *in vivo*. Polipeptídeos e ácidos nucleicos de DXS exemplificadores e métodos de medir a atividade de DXS são descritos em mais detalhes na publicação internacional n° WO 2009/076676, pedido de patente US n° 12/335.071 (publicação US n° 2009/0203102), WO 2010/003007, publicação US n° 2010/0048964, WO 2009/132220, e publicação US n° 2010/0003716.

[00166] Os polipeptídeos da rota DXP exemplificadores incluem, mas não se limitam a quaisquer dentre os seguintes polipeptídeos: Os polipeptídeos de DXS, polipeptídeos de DXR, polipeptídeos de MCT, polipeptídeos de CMK, polipeptídeos de MCS, polipeptídeos de HDS, polipeptídeos de HDR, e polipeptídeos (por exemplo, polipeptídeos de fusão) tendo uma atividade de um, dois, ou mais dos polipeptídeos da rota de DXP. Em particular, os polipeptídeos da rota de DXP incluem polipeptídeos, fragmentos de polipeptídeos, peptídeos e polipeptídeos de fusão que têm pelo menos uma atividade de um polipeptídeo da rota de DXP. Os ácidos nucleicos de rota de DXP exemplificadores incluem ácidos nucleicos que codificam um polipeptídeo, um fragmento de um polipeptídeo, um peptídeo, ou um polipeptídeo de fusão que tem pelo menos uma atividade de um polipeptídeo de rota de DXP. Os polipeptídeos e ácidos nucleicos de rota de DXP exemplificadores incluem polipeptídeos e ácidos nucleicos de ocorrência natural provenientes de quaisquer dos organismos-fonte aqui descritos, bem como polipeptídeos e ácidos nucleicos mutantes derivados de quaisquer dos

organismos-fonte aqui descritos. Os polipeptídeos e ácidos nucleicos da rota de DXP exemplificadores e métodos de medição da atividade do polipeptídeo da rota de DXP são descritos em mais detalhes na publicação internacional nº: WO 2010/148150

[00167] Os polipeptídeos de DXS exemplificadores incluem polipeptídeos, fragmentos de polipeptídeos, peptídeos e polipeptídeos de fusão que têm pelo menos uma atividade de um polipeptídeo de DXS. Os métodos padrões (como os aqui descritos) podem ser usados para determinar se um polipeptídeo tem atividade de polipeptídeo de DXS mediante a medição da capacidade do polipeptídeo para converter piruvato e D-gliceraldeído-3-fosfato em 1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato *in vitro*, em um extrato celular, ou *in vivo*. Polipeptídeos e ácidos nucleicos de DXS exemplificadores e métodos de medir a atividade de DXS são descritos em mais detalhes na publicação internacional n° WO 2009/076676, pedido de patente US n° 12/335.071 (pu blicação US n° 2009/0203102), WO 2010/003007, publicação US n° 201 0/0048964, WO 2009/132220, e publicação US n° 2010/0003716.

[00168] Em particular, os polipeptídeos de DXS convertem piruvato e D-gliceraldeído 3-fosfato em 1-desóxi-d-xilulose 5-fosfato (DXP). Os métodos-padrão podem ser usados para determinar se um polipeptídeo tem atividade de polipeptídeo de DXS mediante a medição da capacidade do dito polipeptídeo para converter piruvato e D-gliceraldeído-3-fosfato *in vitro*, em um extrato celular ou *in vivo*.

[00169] Os polipeptídeos de DXR convertem 1-desóxi-d-xilulose 5-fosfato (DXP) em 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP). Os métodos padrões podem ser usados para determinar se um polipeptídeo tem atividade de polipeptídeo de DXR mediante a medição da capacidade do dito polipeptídeo de converter DXP *in vitro*, em um extrato celular ou *in vivo*.

[00170] Os polipeptídeos de MCT convertem 2-C-metil-D-eritritol 4-

fosfato (MEP) em 4-(citidina 5'-difosfo)-2-metil-D-eritritol (CDP-ME). Os métodos-padrão podem ser usados para determinar se um polipeptídeo tem atividade de polipeptídeo de MCT mediante a medição da capacidade do dito polipeptídeo para converter MEP *in vitro*, em um extrato celular ou *in vivo*.

[00171] Os polipeptídeos de CMK convertem 4-(citidina 5'-difosfo)-2-C-metil-D-eritritol (CDP-ME) em 2-fosfo-4-(citidina 5'-difosfo)-2-C-metil-D-eritritol (CDP-MEP). Métodos-padrão podem ser usados para determinar se um polipeptídeo tem atividade de polipeptídeo de CMK mediante a medição da capacidade do dito polipeptídeo para converter CDP-ME *in vitro*, em um extrato celular ou *in vivo*.

[00172] Os polipeptídeos de MCS convertem 2-fosfo-4-(citidina 5'-difosfo)-2-C-metil-D-eritritol (CDP-MEP) em 2-C-metil-D-eritritol 2, 4-ciclodifosfato (ME-CPP ou cMEPP). Os métodos-padrão podem ser usados para determinar se um polipeptídeo tem atividade de polipeptídeo de MCS mediante a medição da capacidade do dito polipeptídeo para converter CDP-MEP *in vitro*, em um extrato celular ou *in vivo*.

[00173] Os polipeptídeos de HDS convertem 2-C-metil-D-eritritol 2, 4-ciclodifosfato em difosfato de (E)-4-hidróxi-3-metilbut-2-en-1-ila (HMBPP ou HDMAPP). Os métodos-padrão podem ser usados para determinar se um polipeptídeo tem atividade de polipeptídeo de HDS mediante a medição da capacidade do dito polipeptídeo para converter ME-CPP *in vitro*, em um extrato celular ou *in vivo*.

[00174] Os polipeptídeos de HDR convertem difosfato de (E)-4-hidróxi-3-metilbut-2-en-1-ila em difosfato de isopentenila (IPP) e difosfato de dimetil alila (DMAPP). Em uma modalidade, o gene ispH pode ser usado para codificar polipeptídeos de HDR. IspH também é conhecido como 1-hidróxi-2-metil-2-(E)-butenil-4-difosfato redutase, proteína 4Fe-4S, ECK0030, JW0027, lytB, yaaE, e b0029. Métodos-padrão podem ser usados para determinar se um polipeptídeo tem atividade de

polipeptídeo de HDR mediante a medição da capacidade do dito polipeptídeo para converter HMBPP *in vitro*, em um extrato celular ou *in vivo*.

ORGANISMOS FONTE PARA POLIPEPTÍDEOS DA ROTA DE MVA, ISOPRENO SINTASE, IDI, E DA ROTA DE DXP

[00175] Os ácidos nucleicos de isopreno sintase, IDI, da rota de DXP, e/ou da rota de MVA podem ser obtidos a partir de qualquer organismo que contém naturalmente ácidos nucleicos de isopreno sintase, IDI, da rota de DXP, e/ou da rota de MVA. O isopreno é formado naturalmente por uma variedade de organismos, como bactérias, levedura, plantas, e animais. Alguns organismos contêm a rota de MVA para produzir isopreno. Os ácidos nucleicos de isopreno sintase podem ser obtidos, por exemplo, de qualquer organismo que contenha uma isopreno sintase. Os ácidos nucleicos da rota de MVA podem ser obtidos, por exemplo, a partir de qualquer organismo que contenha a rota de MVA. Os ácidos nucleicos da rota de IDI e DXP podem ser obtidos, por exemplo, a partir de qualquer organismo que contenha a rota de IDI e DXP.

[00176] A sequência de ácidos nucleicos dos ácidos nucleicos de isopreno sintase, da rota de DXP, IDI, e/ou rota de MVA podem ser isolados a partir de uma bactéria, fungo, planta, algas, ou cianobactéria. Os organismos-fonte exemplificadores incluem, por exemplo, leveduras, como espécies de *Saccharomyces* (por exemplo, *S. cerevisiae*), bactérias, como espécies de *Escherichia* (por exemplo, *E. coli*), ou espécies de *Methanosarcina* (por exemplo, *Methanosarcina mazei*) ou espécies de *Methanococcoides* (por exemplo, *M. Burtonii)*, plantas, como kudzu ou choupo (por exemplo, *Populus alba* ou *Populus alba x tremula* CAC35696) ou choupo tremedor (por exemplo, *Populus tremuloides*). Fontes exemplificadoras para polipeptídeos de isopreno sintase, IDI, e/ou da rota MVA que podem ser usadas também são descri-

tas nas publicações de pedido de patente internacional n's WO 2009/076676, WO 2010/003007, WO 2009/132220, WO 2010/031062, WO 2010/031068, WO 2010/031076, WO 2010/013077, WO 2010/031079, WO 2010/148150, WO 2010/078457, e WO 2010/148256.

[00177] Em algumas modalidades, o organismo-fonte é um fungo, cujos exemplos são espécies de *Aspergillus* como *A. oryzae* e *A. niger*, espécies de *Saccharomyces* como *S. cerevisiae*, espécies de *Schizosaccharomyces* como *S. pombe*, e espécies de *Trichoderma* como *T. reesei*. Em algumas modalidades, o organismo-fonte é uma célula fúngica filamentosa. O termo "fungos filamentosos" refere-se a todas as formas filamentosas da subdivisão Eumycotina (veja, Alexopoulos, C. J. (1962), Introductory Mycology, Wiley, Nova Iorque, EUA). Esses fungos são caracterizados por um micélio vegetativo com uma parede celular composta de quitina, celulose, e outros polissacarídeos complexos. Os fungos filamentosos são morfologicamente, fisiologicamente, e geneticamente distintos de leveduras. O crescimento vegetativo por fungos filamentosos ocorre por alongamento da hifa e o catabolismo de carbono é obrigatoriamente aeróbico. A célula progenitora fúngica filamentosa pode ser uma célula de uma espécie de, mas não se limitando a, *Trichoderma*, (por exemplo, *Trichoderma reesei*, a transformação assexuada de *Hypocrea jecorina*, anteriormente classificada como *T. longibrachiatum*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma harzianum*) (Sheir-Neirs *et al.*, 1984, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 20: 46-53; ATCC n°56765 e ATCC n°26921); *Penicillium sp.*, *Humicola sp*. (por exemplo, *H. insolens*, *H. lanuginose*, ou *H. grisea*); *Chrysosporium sp.* (por exemplo, *C. lucknowense*), *Gliocladium sp.*, *Aspergillus sp.* (por exemplo, *A. oryzae*, *A. niger*, *A sojae*, *A. japonicus*, *A. nidulans*, ou *A. awamori*) (Ward, M. *et al.*, 1993, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39:738-743, e Goedegebuur *et al.*, 2002, Genet 41: 89-98),

Fusarium sp., (por exemplo, *F. roseum*, *F. graminum F. cerealis*, *F. oxysporuim*, ou *F. venenatum*), *Neurospora sp.*, (por exemplo, *N. crassa*), *Hypocrea sp.*, *Mucor sp.*, (por exemplo, *M. miehei*), *Rhizopus sp. e Emericella sp.* (consulte também, Innis *et al.*, 1985, *Sci*. 228: 21-26). O termo "*Trichoderma*" ou "*Trichoderma sp.*" ou "*Trichoderma spp.*" refere-se a qualquer gênero fúngico anteriormente ou presentemente classificado como *Trichoderma*.

[00178] Em algumas modalidades, o fungo é *A. nidulans*, *A. awamori*, *A. oryzae*, *A. aculeatus*, *A. niger*, *A. japonicus*, *T. reesei*, *T. viride*, *F. oxysporum*, ou *F. solani.* Cepas de Aspergillus são apresentadas em Ward, M. *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 39:738-743 e Goedegebuur *et al.*, 2002, *Curr Gene* 41:89-98, que estão, cada um, aqui incorporados por referência em suas totalidades, particularmente no que diz respeito a fungos. Em modalidades particulares, o fungo é uma cepa de *Trichoderma*, como uma cepa de *T. reesei*. Cepas de *T. reesei* são conhecidas e exemplos não limitadores incluem ATCC n° 13631, ATCC n° 26921, ATCC n° 56764, ATCC n° 56765, ATCC n ° 56767, e NRRL 15709, que estão, cada uma, aqui incorporadas por referência nas suas totalidades, particularmente com relação às cepas de *T. reesei*. Em algumas modalidades, a cepa hospedeira é um derivado de RL-P37. RL-P37 é apresentado em Sheir-Neiss *et al.*, 1984, *Appl. Microbiol. Biotechnology* 20:46–53, a qual está aqui incorporado a titulo de referência, em sua totalidade, particularmente no que diz respeito a cepas de *T. reesei*.

[00179] Em alguns aspectos, o organismo-fonte é uma levedura, como *Saccharomyces sp.*, *Schizosaccharomyces sp.*, *Pichia sp.*, ou *Candida sp*.

[00180] Em alguns aspectos, o organismo fonte é uma bactéria, como cepas de *Bacillus* como *B. lichenformis* ou *B.* subtilis, cepas de *Pantoea* como *P. citrea*, cepas de *Pseudomonas* como *P. alcaligenes*,

cepas de *Streptomyces* como *S. lividans* ou *S. rubiginosus*, cepas de *Escherichia* como *E. coli*, cepas de *Enterobacter*, cepas de *Streptococcus*, ou cepas de *Archaea* como *Methanosarcina mazei*.

[00181] Como usado aqui, "o gênero *Bacillus*" inclui todas as espécies dentro do gênero "*Bacillus*" conforme é de conhecimento dos versados na técnica, incluindo, mas não se limitando a *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. lentus*, *B. brevis*, *B.* stearothermophilus, *B. alkalophilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. clausii*, *B. halodurans*, *B. megaterium*, *B. coagulans*, *B. circulans*, *B. lautus*, e *B. thuringiensis*. É reconhecido que o gênero *Bacillus* continua a sofrer reorganização taxonômica. Desta forma, pretende-se que o gênero inclua espécies que foram reclassificadas, incluindo, mas não se limitando a organismos tais como *B. stearothermophilus*, que é agora chamado "*Geobacillus stearothermophilus*". A produção de endosporos resistentes na presença de oxigênio é considerada a característica que define o gênero *Bacillus*, embora esta característica também se aplique aos recentemente designados *Alicyclobacillus*, *Amphibacillus*, *Aneurinibacillus*, *Anoxybacillus*, *Brevibacillus*, *Filobacillus*, *Gracilibacillus*, *Halobacillus*, *Paenibacillus*, *Salibacillus*, *Thermobacillus*, *Ureibacillus*, e *Virgibacillus*.

[00182] Em alguns aspectos, o organismo-fonte é uma bactéria gram-positiva. Alguns exemplos não limitadores incluem cepas de *Streptomyces*(por exemplo, *S. lividans*, *S. coelicolor*, ou *S. griseus*) e *Bacillus*. Em alguns aspectos, o organismo-fonte é uma bactéria gram-negativa, como *E. coli* ou *Pseudomonas sp.* Em alguns aspectos, o organismo-fonte é *L. acidophilus*.

[00183] Em alguns aspectos, o organismo fonte é uma planta, como uma planta da família Fabaceae, como a subfamília Faboideae. Em alguns aspectos, o organismo fonte é kudzu, choupo (como *Populus alba x tremula* CAC35696), choupo tremedor (como *Populus tremuloides*), ou *Quercus robur*.

[00184] Em alguns aspectos, o organismo-fonte é uma alga, como algas verdes, algas vermelhas, glaucófitas, cloraracniófitas, euglenófitas, cromista ou dinoflagelados.

[00185] Em alguns aspectos, o organismo fonte é uma cianobactéria, como a cianobactéria classificada em qualquer um dos seguintes grupos com base na morfologia: *Chroococcales*, *Pleurocapsales*, *Oscillatoriales*, *Nostocales*, ou *Stigonematales*.

ÁCIDOS NUCLEICOS E POLIPEPTÍDEOS DE FOSFOCETOLASE

[00186] Em alguns aspectos da invenção, as células recombinantes descritas em qualquer uma das composições e métodos descritos aqui podem compreender adicionalmente um ou mais ácidos nucleicos que codificam um polipeptídeo de fosfocetolase ou um polipeptídeo tendo atividade de fosfocetolase. Em alguns aspectos, o polipeptídeo de fosfocetolase é um polipeptídeo endógeno. Em alguns aspectos, o ácido nucleico endógeno que codifica um polipeptídeo de fosfocetolase está ligado de maneira funcional a um promotor constitutivo. Em alguns aspectos, o ácido nucleico endógeno que codifica um polipeptídeo de fosfocetolase está ligado de maneira funcional a um promotor induzível. Em alguns aspectos, o ácido nucleico endógeno que codifica um polipeptídeo de fosfocetolase está ligado de maneira funcional a um promotor forte. Em alguns aspectos, mais de um ácido nucleico endógeno que codifica um polipeptídeo de fosfocetolase é usado (por exemplo 2, 3, 4, ou mais cópias de um ácido nucleico endógeno que codifica um polipeptídeo de fosfocetolase). Em um aspecto particular, as células são manipuladas para superexpressar o polipeptídeo de fosfocetolase endógeno em relação às células do tipo selvagem. Em alguns aspectos, o ácido nucleico endógeno que codifica um polipeptídeo de fosfocetolase está ligado de maneira funcional a um promotor fraco.

[00187] As enzimas fosfocetolase catalisam a conversão de xilulose 5-fosfato para gliceraldeído 3-fosfato e acetil fosfato e/ou a conversão

de frutose 6-fosfato em eritrose 4-fosfato e acetil fosfato. Em certas modalidades, a enzima fosfocetolase é capaz de catalisar a conversão de xilulose 5-fosfato em gliceraldeído 3-fosfato e acetil fosfato. Em outras modalidades, a enzima fosfocetolase é capaz de catalisar a conversão de frutose 6-fosfato em eritrose 4-fosfato e acetil fosfato. Dessa forma, sem se ater à teoria, a expressão de fosfocetolase conforme aqui apresentada pode resultar em um aumento na quantidade de acetil fosfato produzida a partir de uma fonte de carboidrato. Este acetil fosfato pode ser convertido em acetil-CoA que pode, então, ser utilizado pelas atividades enzimáticas da rota de MVA para produzir mevalonato, moléculas precursoras de isoprenoide, isopreno e/ou isoprenoides. Dessa forma, a quantidade destes compostos produzida a partir de um substrato de carboidrato pode ser aumentada. Alternativamente, a produção de acetil-P e AcCoA pode ser aumentada sem o aumento ser refletido em maior concentração intracelular. Em certas modalidades, as concentrações intracelulares de acetil-P ou acetil-CoA vão permanecer inalteradas ou mesmo diminuir, embora a reação de fosfocetolase esteja ocorrendo.

[00188] Os ácidos nucleicos de fosfocetolase exemplificadores incluem os ácidos nucleicos que codificam um polipeptídeo, fragmento de um polipeptídeo, peptídeo, ou polipeptídeo de fusão que tem pelo menos uma atividade de um polipeptídeo de fosfocetolase. Os polipeptídeos e ácidos nucleicos de fosfocetolases exemplificadores incluem polipeptídeos e ácidos nucleicos de ocorrência natural de qualquer um dos organismos fonte descritos no presente documento, bem como polipeptídeos e ácidos nucleicos mutantes derivados de qualquer um dos organismos fonte descritos no presente documento.

[00189] Métodos-padrão podem ser usados para determinar se um polipeptídeo tem atividade de peptídeo fosfocetolase mediante a medição da capacidade do peptídeo para converter D-frutose 6-fosfato ou

D-xilulose 5-fosfato em acetil-P. A acetil-P pode então ser convertida no hidroxamato de ferril acetila, que pode ser detectado espectrofotometricamente (Meile *et al.*, 2001, *J. Bact.* 183:2929-2936). Qualquer polipeptídeo identificado como tendo atividade de peptídeo de fosfocetolase conforme descrito aqui é adequado para uso na presente invenção.

[00190] Em outros aspectos, os ácidos nucleicos de fosfocetolase exemplificadores incluem, por exemplo, uma fosfocetolase isolada a partir de *Lactobacillus reuteri*, *Bifidobacterium longum*, *Ferrimonas* balearica, *Pedobactor saltans*, *Streptomyces griseus*, e/ou *Nocardiopsis dassonvillei*. Exemplos adicionais de enzimas fosfocetolase que podem ser usadas na presente invenção são descritos em U.S. 7.785.858 e na publicação de pedido de patente internacional n° WO 2011/159853 que estão aqui incorporados a título de referência.

ROTAS ENVOLVENDO A ROTA DE ENTNER-DOUDOROFF

[00191] A rota de Entner-Doudoroff (ED) é uma alternativa para a rota Emden-Meyerhoff-Parnass (EMP –glicólise). Alguns organismos, como *E. coli*, abrigam ambas as rotas ED e EMP, embora outros tenham apenas uma ou a outra. *Bacillus* subtilis tem apenas a rota EMP, enquanto *Zymomonas mobilis* tem apenas a rota ED (Peekhaus e Conway, 1998, *J. Bact.* 180:3495-3502; Stulke e Hillen, 2000, *Annu. Rev. Microbiol.* 54:849–880; Dawes et al. 1966. *Biochem. J.*, 98:795-803).

[00192] A fosfogluconato desidratase (edd) remove uma molécula de H_2O de 6-fosfo-D-gluconato para formar 2-desidro-3-desoxi-D-gluconato 6-fosfato, embora a 2-ceto-3-desoxigluconato 6-fosfato aldolase (eda) catalise uma clivagem de aldol (Egan *et al.* 1992. *J. Bact.* 174:4638-4646). Os dois genes estão em um operon.

[00193] Os metabólitos que podem ser dirigidos na rota de fosfocetolase podem também ser desviados para a rota de ED. Para evitar a

perda de metabólito para a rota de ED, a atividade do gene de fosfogluconato desidratase (por exemplo, o gene defosfogluconato desidratase endógeno) e/ou um gene de 2-ceto-3-desoxigluconato 6-fosfato aldolase (por exemplo, o gene endógeno de 2-ceto-3-desoxigluconato 6-fosfato aldolase) é atenuada. Uma forma de alcançar a atenuação é mediante a deleção de fosfogluconato desidratase (edd) e/ou 2-ceto-3-desoxigluconato 6-fosfato aldolase (eda). Isto pode ser feito por substituição de um ou ambos os genes por um cassete de cloranfenicol ou canamicina seguido de espiralização (looping-out) do cassete. Sem estas atividades enzimáticas, mais carbono pode fluir através da enzima fosfocetolase, aumentando assim o rendimento de mevalonato, isopreno ou isoprenoides.

[00194] A atividade de fosfogluconato desidratase (edd) e/ou 2-ceto-3-desoxigluconato 6-fosfato aldolase (eda) pode também ser diminuída por outras manipulações moleculares das enzimas. A redução da atividade enzimática pode ser qualquer quantidade de redução da atividade específica ou da atividade total em comparação a quando nenhuma manipulação foi efetuada. Em alguns casos, a redução da atividade enzimática é reduzida ao menos cerca de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99%.

[00195] Em alguns casos, a atenuação da atividade do gene defosfogluconato desidratase endógeno e/ou do gene 2-ceto-3-desoxigluconato 6-fosfato aldolase endógeno resulta em mais fluxo de carbono para a rota biossintética dependente de mevalonato em comparação com células que não têm gene de fosfogluconato desidratase endógeno atenuado e/ou a expressão gênica de acetato quinase 2-ceto-3-desoxigluconato 6-fosfato aldolase endógena.

ROTAS ENVOLVENDO A RAMIFICAÇÃO OXIDANTE DA ROTA DE

PENTOSE FOSFATO

[00196] A *E. coli* usa a rota de pentose fosfato para decompor as hexoses e pentoses e para fornecer células com intermediários para várias rotas anabólicas. É também um produtor importante de NADPH. A rota de pentose fosfato é composta de uma ramificação oxidante (com enzimas como glicose 6-fosfato 1-desidrogenase (*zwf*), 6-fosfogluconolactonase (*pgl*) ou 6-fosfogluconato desidrogenase (*gnd*)) e uma ramificação não oxidante (com enzimas transcetolase (*tktA*), transaldolase (*talA* ou talB), ribulose-5-fosfato-epimerase e (ou) ribose-5-fosfato epimerase) (Sprenger, 1995, *Arch. Microbiol.* 164:324-330).

[00197] Para direcionar o carbono para a enzima fosfocetolase, a ramificação não oxidante da expressão da rota de pentose fosfato (transcetolase, transaldolase, ribulose-5-fosfato-epimerase e (ou) ribose-5-fosfato epimerase) pode ser modulada (por exemplo, aumento da atividade enzimática) para permitir que mais carbono flua em direção à frutose 6-fosfato e xilulose 5-fosfato, aumentando assim a eventual produção de mevalonato, isopreno e isoprenoides. O aumento da atividade de transcetolase, transaldolase, ribulose-5-fosfato-epimerase e (ou) ribose-5-fosfato epimerase pode ser qualquer quantidade de aumento da atividade específica ou atividade total como em comparação com quando nenhuma manipulação foi efetuada. Em alguns casos, a atividade enzimática é aumentada em pelo menos cerca de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100%. Em alguns aspectos, a atividade de transcetolase, transaldolase, ribulose-5-fosfato-epimerase e (ou) ribose-5-fosfato epimerase é modulada mediante o aumento da atividade de uma transcetolase endógena, transaldolase, ribulose-5-fosfato-epimerase e (ou) ribose-5-fosfato epimerase. Isto pode ser feito pela substituição do promotor endógeno do gene de transcetolase, transal-

dolase, ribulose-5-fosfato-epimerase e (ou) ribose-5-fosfato epimerase por um promotor sintético de alta expressão constitutiva. Os genes que codificam transcetolase, transaldolase, ribulose-5-fosfato-epimerase e (ou) ribose-5-fosfato epimerase podem também ser clonados em um plasmídeo atrás de um promotor adequado. O aumento da atividade de transcetolase, transaldolase, ribulose-5-fosfato-epimerase e (ou) ribose-5-fosfato epimerase pode resultar em mais fluxo de carbono para a rota biossintética dependente de mevalonato em comparação com células que não têm o aumento da expressão de transcetolase, transaldolase, ribulose-5-fosfato-epimerase e (ou) ribose-5-fosfato epimerase.

ROTAS ENVOLVENDO FOSFOFRUTOQUINASE

[00198] A fosfofrutoquinase é uma enzima crucial da glicólise que catalisa a fosforilação de frutose 6-fosfato. A E. coli tem duas isozimas codificadas por pfkA e pfkB. A maior parte da atividade de fosfofrutoquinase na célula é causada por pfkA (Kotlarz et al., 1975, *Biochim. Biophys. Acta* 381:257-268).

[00199] Para direcionar o carbono para a enzima fosfocetolase, a expressão de fosfofrutoquinase pode ser modulada (por exemplo, diminuição da atividade enzimática) para permitir que mais carbono flua para frutose 6-fosfato e xilulose 5-fosfato, aumentando assim a eventual produção de mevalonato, isopreno, e isoprenoides. A redução da atividade de fosfofrutoquinase pode ser qualquer quantidade de redução da atividade específica ou da atividade total em comparação a quando nenhuma manipulação foi efetuada. Em alguns casos, a redução da atividade enzimática é reduzida pelo menos cerca de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%. ou 100%. Em alguns aspectos, a atividade de fosfofrutoquinase é modulada pela redução da atividade de uma fosfo-

frutoquinase endógena. Isto pode ser feito pela substituição do promotor do gene da fosfofrutoquinase endógena com um promotor sintético que se expressa constitutivamente em níveis baixos. O gene que codifica fosfofrutoquinase pode também ser deletado. A redução da atividade de fosfofrutoquinase pode resultar em mais fluxo de carbono para a rota biossintética dependente de mevalonato em comparação com as células que não têm a expressão reduzida de fosfofrutoquinase.

MUTAÇÕES ADICIONAIS DA CÉLULA HOSPEDEIRA

[00200] A invenção também contempla mutações adicionais da célula hospedeira que aumentam o fluxo de carbono através da rota de MVA. Mediante o aumento do fluxo de carbono, mais isopreno pode ser produzido. Células recombinantes que compreendem qualquer um dos ácidos nucleicos expressos heterologamente (por exemplo, um ácido nucleico de acetoacetil-CoA sintase expresso heterologamente), conforme descrito aqui também podem ser manipuladas para fluxo de carbono aumentado para a produção de mevalonato, sendo que a atividade de uma ou mais enzimas do grupo que consiste em: (a) citrato sintase, (b) fosfotransacetilase; (c) acetato quinase; (d) lactato desidrogenase; (e) enzima málica dependente de NADP, e; (f) piruvato desidrogenase é modulada.

ROTA DE CITRATO SINTASE

[00201] A citrato sintase catalisa a condensação de oxaloacetato e acetil-CoA para formar citrato, um metabólito do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) (Ner, S. et al. 1983. *Biochemistry* 22: 5243-5249; Bhayana, V. e Duckworth, H. 1984. *Biochemistry* 23: 2900-2905) (figura 5). Em *E. coli*, esta enzima, codificada por *gltA*, se comporta como um trímero de subunidades diméricas. A forma hexamérica permite que a enzima seja regulada alostericamente por NADH. Esta enzima foi amplamente estudada (Wiegand, G., e Remington, S. 1986. *Annual Rev. Biophysics Biophys. Chem.* 15: 97-117; Duckworth et al. 1987.

Biochem Soc Symp. 54:83-92; Stockell, D. et al. 2003. *J. Biol. Chem.* 278: 35435-43; Maurus, R. et al. 2003. *Biochemistry.* 42:5555-5565). Para evitar inibição alostérica por NADH, a substituição ou suplementação com a citrato sintase de *Bacillus subtilis* insensível ao NADH foi considerada (Underwood et al. 2002. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1071-1081; Sanchez et al. 2005. *Met. Eng.* 7:229-239).

[00202] A reação catalisada pela citrato sintase está competindo diretamente com a tiolase que catalisa a primeira etapa da rota do mevalonato, já que as duas possuem a acetil-CoA como um substrato (Hedl et al. 2002. *J. Bact.* 184:2116-2122). Portanto, o versado na técnica pode modular a expressão da citrato sintase (por exemplo, reduzindo a atividade enzimática) para permitir que mais carbono flua para dentro da rota do mevalonato, aumentando assim a produção eventual de mevalonato e isopreno. A redução da atividade da citrato sintase pode ser qualquer quantidade de redução da atividade específica ou da atividade total em comparação a quando nenhuma manipulação foi efetuada. Em alguns casos, a redução da atividade enzimática é reduzida ao menos cerca de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99%. Em alguns aspectos, a atividade da citrato sintase é modulada pela redução da atividade de um gene endógeno de citrato sintase. Isto pode ser feito por troca cromossômica de um gene endógeno de citrato sintase por um transgene que codifica uma citrato sintase insensível ao NADH ou pelo uso de um transgene que codifica uma citrato sintase insensível ao NADH que é derivada de *Bacillus subtilis*. A atividade da citrato sintase também pode ser modulada (por exemplo, reduzida) pela substituição do promotor endógeno do gene da citrato sintase por um promotor sintético de baixa expressão constitutiva. A redução da atividade da citrato sintase pode resultar em mais fluxo de carbono para a

rota biossintética dependente de mevalonato em comparação a micro-organismos que não possuem expressão reduzida da citrato sintase.

ROTAS QUE ENVOLVEM A FOSFOTRANSACETILASE E/OU ACETATO QUINASE

[00203] A fosfotransacetilase (*pta*) (Shimizu et al. 1969. *Biochim. Biophys. Acta* 191: 550-558) catalisa a conversão reversível entre acetil-CoA e acetilfosfato (acetil-P), enquanto a acetato quinase (ackA) (Kakuda, H. et al. 1994. *J. Biochem.* 11:916-922) usa acetil-P para formar acetato. Estes genes podem ser transcritos como um operon em *E. coli*. Juntos, eles catalisam a dissimilação de acetato, com a liberação de ATP. Desta forma, o versado na técnica pode aumentar a quantidade de acetil Co-A disponível mediante a atenuação da atividade do gene de fosfotransacetilase (por exemplo, o gene de fosfotransacetilase endógeno) e/ou um gene de acetato quinase (por exemplo, o gene de acetato quinase endógeno). Uma forma de se obter atenuação é por deleção de fosfotransacetilase (pta) e/ou de acetato quinase (ackA). Isto pode ser feito por substituição de um ou ambos os genes por um cassete de cloranfenicol seguido de espiralização (looping-out) do cassete. O acetato é produzido por *E. coli* por uma variedade de razões (Wolfe, A. 2005. *Microb. Mol. Biol. Rev.* 69:12-50). Sem se ater à teoria, uma vez que a ackA-pta usa acetil-CoA, a deleção destes genes poderia permitir que o carbono não se desviasse para acetato e aumentasse o rendimento de mevalonato e/ou isopreno.

[00204] Em alguns aspectos, o micro-organismo recombinante produz quantidades reduzidas de acetato em comparação aos micro-organismos que não têm expressão do gene endógeno da fosfotransacetilase e/ou do gene endógeno de acetato quinase atenuada. A redução na quantidade de acetato produzido pode ser medida por ensaios de rotina conhecidos do versado na técnica. A quantidade de redução do acetato é de ao menos cerca de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%,

7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% em comparação a quando nenhuma manipulação molecular é feita.

[00205] A atividade da fosfotransacetilase (pta) e/ou da acetato quinase (ackA) também pode ser reduzida por outra manipulação molecular das enzimas. A redução da atividade enzimática pode ser qualquer quantidade de redução da atividade específica ou da atividade total em comparação a quando nenhuma manipulação foi efetuada. Em alguns casos, a redução da atividade enzimática é reduzida ao menos cerca de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99%.

[00206] Em alguns casos, a atenuação da atividade do gene de fosfotransacetilase endógeno e/ou do gene endógeno de acetato quinase resulta em mais fluxo de carbono para dentro da rota biossintética dependente de mevalonato em comparação aos micro-organismos que não têm a expressão do gene endógeno da fosfotransacetilase e/ou do gene endógeno de acetato quinase atenuada.

ROTAS ENVOLVENDO A LACTATO DESIDROGENASE

[00207] Em *E. coli*, D-lactato é produzido a partir de piruvato através da enzima lactato desidrogenase (ldhA – figura 5) (Bunch, P. et al. 1997. *Microbiol.* 143:187-195). A produção de lactato é acompanhada pela oxidação de NADH, portanto, o lactato é produzido quando oxigênio está limitado e não pode acomodar todos os equivalentes redutores. Desta forma, a produção de lactato poderia ser uma fonte para consumo de carbono. Como tal, para otimizar o fluxo de carbono através da produção de mevalonato (e produção de isopreno, se for desejado), um elemento versado na técnica pode modular a atividade da lactato desidrogenase, como através da redução da atividade da en-

zima.

[00208] Consequentemente, em um aspecto, a atividade da lactato desidrogenase pode ser modulada por atenuação da atividade de um gene endógeno de lactato desidrogenase. Tal atenuação pode ser conseguida pela deleção do gene endógeno da lactato desidrogenase. Outras formas de atenuação da atividade do gene da lactato desidrogenase conhecidas do versado na técnica podem, também, ser usadas. Pela manipulação da rota que envolve a lactato desidrogenase, o micro-organismo recombinante produz quantidades reduzidas de lactato em comparação aos micro-organismos que não têm expressão gênica atenuada da lactato desidrogenase endógena. A redução na quantidade de lactato produzido pode ser medida por ensaios de rotina conhecidos do versado na técnica. A quantidade de redução do lactato é de ao menos cerca de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% em comparação a quando nenhuma manipulação molecular é feita.

[00209] A atividade da lactato desidrogenase também pode ser reduzida por outras manipulações moleculares da enzima. A redução da atividade enzimática pode ser qualquer quantidade de redução da atividade específica ou da atividade total em comparação a quando nenhuma manipulação foi efetuada. Em alguns casos, a redução da atividade enzimática é reduzida em ao menos cerca de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99%.

[00210] Consequentemente, em alguns casos, a atenuação da atividade do gene endógeno da lactato desidrogenase resulta em mais fluxo de carbono para a rota biossintética dependente de mevalonato em comparação aos micro-organismos que não têm expressão gênica

da lactato desidrogenase endógena atenuada.

ROTAS ENVOLVENDO A ENZIMA MÁLICA

[00211] A enzima málica (em *E. coli sfcA* e *maeB*) é uma enzima anaplerótica que catalisa a conversão de malato em piruvato (usando NAD+ ou NADP+) pela equação abaixo:

$$\text{(S)-malato} + \text{NAD(P)}^+ \rightleftharpoons \text{piruvato} + CO_2 + \text{NAD(P)H}$$

[00212] Desta forma, os dois substratos desta enzima são (S)-malato e $NAD(P)^+$, enquanto seus 3 produtos são piruvato, CO_2, e NADPH.

[00213] A expressão da enzima málica dependente de NADP (maeB – Figura 5) (Iwikura, M. et al. 1979. *J. Biochem.* 85: 1355-1365) pode auxiliar o aumento do rendimento de mevalonato e/ou isopreno por 1) levar o carbono do ciclo de TCA de volta ao piruvato, direcionar o precursor de acetil-CoA, direcionar por si só o precursor da rota de mevalonato e 2) produzir NADPH adicional, que poderia ser usado na reação de HMG-CoA redutase (Oh, MK et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277: 13175-13183; Bologna, F. et al. (2007) *J. Bact.* 189:5937-5946).

[00214] Desta forma, mais substrato inicial (piruvato ou acetil-CoA) para a produção a jusante de mevalonato e/ou isopreno pode ser obtido pela modulação, tal como aumento, da atividade e/ou expressão da enzima málica. O gene da enzima málica dependente de NADP pode ser um gene endógeno. Uma forma não limitadora para fazer isto é mediante a substituição do promotor do gene endógeno da enzima málica dependente de NADP por um promotor sintético que se expressa constitutivamente. Outra forma não limitadora de aumentar a atividade enzimática é pelo uso de um ou mais ácidos nucleicos heterólogos que codificam um polipeptídeo da enzima málica dependente de NADP. O versado na técnica pode monitorar a expressão do RNA de maeB durante a fermentação ou cultivo usando técnicas de biologia molecular facilmente disponíveis.

[00215] Consequentemente, em algumas modalidades, o micro-organismo recombinante produz quantidades aumentadas de piruvato em comparação aos micro-organismos que não têm expressão aumentada de um gene da enzima málica dependente de NADP. Em alguns aspectos, o aumento da atividade de um gene da enzima málica dependente de NADP resulta em mais fluxo de carbono para a rota biossintética dependente de mevalonato em comparação aos micro-organismos que não têm expressão gênica da enzima málica dependente de NADP aumentada.

[00216] O aumento na quantidade de piruvato produzido pode ser medida por ensaios de rotina conhecidos do versado na técnica. A quantidade do aumento do piruvato pode ser de ao menos cerca de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% em comparação a quando nenhuma manipulação molecular é feita.

[00217] A atividade da enzima málica também pode ser aumentada por outras manipulações moleculares da enzima. O aumento da atividade enzimática pode ser qualquer quantidade de aumento da atividade específica ou da atividade total em comparação a quando nenhuma manipulação foi efetuada. Em alguns casos, o aumento da atividade enzimática é de ao menos cerca de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99%.

ROTAS QUE ENVOLVEM O COMPLEXO DE PIRUVATO DESIDROGENASE

[00218] O complexo da piruvato desidrogenase, que catalisa a descarboxilação de piruvato em acetil-CoA, é composto das proteínas codificadas pelos genes aceE, aceF e lpdA. A transcrição destes genes é regulada por vários reguladores. Desta forma, um versado na técnica

pode aumentar a acetil-CoA pela modulação da atividade do complexo de piruvato desidrogenase. A modulação pode ser para aumentar a atividade e/ou a expressão por exemplo, expressão constante) do complexo de piruvato desidrogenase. Isto pode ser feito por diferentes formas, por exemplo, pela colocação de um promotor constitutivo forte, como PL.6 (aattcatataaaaaacatacagata-ccatctgcggtgataaattatctctggcggtgttgacataaataccactggcggtgatactgag-acatcagcaggacgcactgaccaccatgaaggtg - promotor lambda, GenBank NC_001416 (SEQ ID NO:15), na frente do operon ou uso de um ou mais promotores sintéticos que se expressam constitutivamente.

[00219] Consequentemente, em um aspecto, a atividade da piruvato desidrogenase é modulada mediante o aumento da atividade de um ou mais genes do complexo da piruvato desidrogenase que consiste em (a) piruvato desidrogenase (E1), (b) di-hidrolipoil transacetilase, e (c) di-hidrolipoil desidrogenase. Entende-se que qualquer um, dois ou três desses genes podem ser manipulados para aumentar a atividade da piruvato desidrogenase. Em outro aspecto, a atividade do complexo da piruvato desidrogenase pode ser modulada pela atenuação da atividade de um gene repressor do complexo de piruvato desidrogenase endógeno, detalhado adicionalmente abaixo. A atividade de um repressor do complexo de piruvato desidrogenase endógeno pode ser atenuada por deleção do gene repressor do complexo de piruvato desidrogenase endógeno.

[00220] Em alguns casos, um ou mais genes do complexo de piruvato desidrogenase são genes endógenos. Outra forma de aumentar a atividade do complexo de piruvato desidrogenase é por introduzir no micro-organismo um ou mais ácidos nucleicos heterólogos que codificam um ou mais polipeptídeos do grupo que consiste em (a) piruvato desidrogenase (E1), (b) di-hidrolipoil transacetilase, e (c) di-hidrolipoil desidrogenase.

[00221] Pelo uso de qualquer um destes métodos, o micro-organismo recombinante pode produzir quantidades aumentadas de acetil Co-A em comparação a micro-organismos nos quais a atividade da piruvato desidrogenase não é modulada. A modulação da atividade da piruvato desidrogenase pode resultar em mais fluxo de carbono para dentro da rota biossintética dependente de mevalonato em comparação aos micro-organismos que não têm expressão de piruvato desidrogenase modulada.

COMBINAÇÕES DE MUTAÇÕES

[00222] Entende-se que para qualquer uma das enzimas e/ou rotas enzimáticas aqui descritas, manipulações moleculares que modulam qualquer combinação (duas, três, quatro, cinco ou seis) das enzimas e/ou rotas enzimáticas aqui descritas são expressamente contempladas. Para facilidade de menção das combinações, a citrato sintase (gltA) é designada como A, a fosfotransacetilase (ptaB) é designada como B, a acetato quinase (ackA) é designada como C, a lactato desidrogenase (ldhA) é designada como D, a enzima málica (sfcA ou maeB) é designada como E, e a piruvato descarboxilase (aceE, aceF, e/ou lpdA) é designada como F. Conforme discutido acima, as enzimas aceE, aceF, e/ou lpdA do complexo de piruvato descarboxilase podem ser usadas sozinhas, ou duas de três enzimas, ou três de três enzimas para aumentar a atividade da piruvato descarboxilase.

[00223] Consequentemente, para combinações de quaisquer duas das enzimas A-F, combinações não limitadoras que podem ser usadas são: AB, AC, AD, AE, AF, BC, BD, BE, BF, CD, CE, CF, DE, DF e EF. Para combinações de quaisquer três das enzimas A-F, combinações não limitadoras que podem ser usadas são: ABC, ABD, ABE, ABF, BCD, BCE, BCF, CDE, CDF, DEF, ACD, ACE, ACF, ADE, ADF, AEF, BDE, BDF, BEF, e CEF. Para combinações de quaisquer quatro das enzimas A-F, combinações não limitadoras que podem ser usadas são:

ABCD, ABCE, ABCF, ABDE, ABDF, ABEF, BCDE, BCDF, CDEF, ACDE, ACDF, ACEF, BCEF, BDEF, e ADEF. Para combinações de quaisquer cinco das enzimas A-F, combinações não limitadoras que podem ser usadas são: ABCDE, ABCDF, ABDEF, BCDEF, ACDEF, e ABCEF. Em outro aspecto, combinações de todas as seis enzimas são usadas: ABCDEF.

[00224] Consequentemente, o micro-organismo recombinante, conforme descrito aqui, pode obter produção de mevalonato aumentada que é aumentada em comparação aos micro-organismos que não são cultivados sob condições de atividade do ciclo do ácido tri-carboxílico (TCA), sendo que o fluxo metabólico de carbono no micro-organismo recombinante é direcionado para a produção de mevalonato pela modulação da atividade de uma ou mais enzimas do grupo que consiste em (a) citrato sintase, (b) fosfotransacetilase e/ou acetato quinase, (c) lactato desidrogenase, (d) enzima málica, e (e) complexo de piruvato descarboxilase.

OUTROS REGULADORES E FATORES PARA O AUMENTO DA PRODUÇÃO DE ISOPRENO

[00225] Outras manipulações moleculares podem ser usadas para aumentar o fluxo de carbono para a produção de isopreno. Um método é reduzir, diminuir ou eliminar os efeitos de reguladores negativos para vias que se alimentam na via do mevalonato. Por exemplo, em alguns casos, os genes aceEF-lpdA estão em um operon, com um quarto gene a montante pdhR. O pdhR é um regulador negativo da transcrição de seu operon. Na ausência de piruvato, ele se liga ao seu promotor alvo e reprime a transcrição. Ele também regula ndh e cyoABCD da mesma forma (Ogasawara, H. *et al.* 2007. *J. Bact.* 189:5534-5541). Em um aspecto, a deleção do regulador de pdhR pode melhorar o suprimento de piruvato e, portanto, a produção de mevalonato e/ou isopreno.

[00226] Em outros aspectos, a introdução de 6-fosfoglicono-lactonase (PGL) em micro-organismos (como várias cepas de *E. coli*) que não possuem PGL pode ser usada para melhorar a produção de mevalonato e/ou isopreno. O PGL pode ser introduzido usando integração cromossômica ou veículos extra-cromossômicos, como plasmídeos. Em outros aspectos, a PGL pode ser deletada do genoma dos micro-organismos (por exemplo, várias cepas de *E. coli*) que expressam uma PGL endógena para melhorar a produção de mevalonato e/ou isopreno. Em alguns aspectos, a deleção de PGL resulta em qualquer de cerca de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, ou 100%, inclusive, incluindo quaisquer valores entre estas porcentagens, de maior rendimento percentual de isopreno em comparação aos micro-organismos que expressam PGL. Em outros aspectos, a deleção de PGL resulta em qualquer de cerca de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, ou 100%, inclusive, incluindo quaisquer valores entre estas porcentagens, de maior rendimento percentual de isopreno em comparação aos micro-organismos que expressam PGL. Em outros aspectos, a deleção de PGL resulta em qualquer de cerca de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, ou 100%, inclusive, incluindo quaisquer valores entre estas porcentagens, de maior índice de produtividade celular para isopreno em comparação aos micro-organismos que expressam PGL. Em outros aspectos, a deleção de PGL resulta em qualquer de cerca de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, ou 100%, inclusive, incluindo quaisquer valores entre estas porcentagens, de maior produtividade volumétrica de isopreno em comparação aos micro-organismos que expressam PGL. Em outros aspectos, a deleção de PGL resulta em qualquer de cerca de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, ou 100%, inclusive, incluindo quaisquer valores entre estas porcentagens, de maior produtividade específica de pico de isopreno em comparação

aos micro-organismos que expressam PGL. Em alguns aspectos, a deleção de PGL resulta na produtividade específica de pico sendo mantida durante um período mais longo em comparação aos micro-organismos que expressam PGL.

CÉLULAS HOSPEDEIRAS EXEMPLIFICADORAS

[00227] Um versado na técnica irá reconhecer que os vetores de expressão são projetados para conter certos componentes que otimizam a expressão gênica para certas cepas hospedeiras. Tais componentes de otimização incluem, mas não se limitam a uma origem de replicação, promotores, e intensificadores. Os vetores e componentes aqui mencionados são descritos para fins exemplificadores e não se destinam a estreitar o escopo da invenção.

[00228] Qualquer micro-organismo ou progênie do mesmo pode ser usado para expressar qualquer um dos genes (heterólogos ou endógenos) aqui descritos. As células bacterianas, incluindo bactérias gram-positivas ou gram-negativas podem ser usadas para expressar qualquer um dos genes aqui descritos. Em particular, os genes aqui descritos podem ser expressos em qualquer um dentre células de *E. coli*, *P. citrea*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. lentus*, *B. brevis*, *B. stearothermophilus*, *B. alkalophilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. clausii*, *B. halodurans*, *B. megaterium*, *B. coagulans*, *B. circulans*, *B. lautus*, *B. thuringiensis*, *S. albus*, *S. lividans*, *S. coelicolor*, *S. griseus*, *Pseudomonas sp.*, *P. alcaligenes*, e *L. acidophilus*. Em alguns aspectos, as células bacterianas para uso em qualquer uma das composições ou métodos aqui descritos são de *Corynebacterium spp*. Em alguns aspectos, as células bacterianas para uso em qualquer uma das composições ou métodos aqui descritos são de *Lactobacilus spp.*, como *Lactobacilus lactis*.

[00229] Há vários tipos de células anaeróbicas que podem ser usadas como células hospedeiras nas composições e métodos da presen-

te invenção. Em um aspecto da invenção, as células descritas em qualquer uma das composições ou métodos aqui descritos são células anaeróbicas obrigatórias e sua progênie. Os anaeróbios obrigatórios tipicamente não crescem bem, caso cresçam, em condições nas quais oxigênio está presente. Deve ser compreendido que uma pequena quantidade de oxigênio pode estar presente, isto é, os anaeróbios obrigatórios têm um certo nível de tolerância para um nível baixo de oxigênio. Em um aspecto, anaeróbios obrigatórios manipulados para produzir isopreno podem servir como células hospedeiras para qualquer um dos métodos e/ou composições aqui descritas e são cultivados sob condições substancialmente sem oxigênio, sendo que a quantidade de oxigênio presente não é nociva para o crescimento, manutenção, e/ou fermentação dos anaeróbios.

[00230] Em um outro aspecto da invenção, as células hospedeiras descritas e/ou usadas em qualquer uma das composições ou métodos aqui descritos são células anaeróbicas facultativas e sua progênie. Os anaeróbios facultativos podem gerar ATP celular por respiração aeróbica (por exemplo, utilização do ciclo TCA), se oxigênio estiver presente. Entretanto, os anaeróbios facultativos também podem crescer na ausência de oxigênio. Isto é o oposto dos anaeróbios obrigatórios que morrem ou crescem fracamente na presença de quantidades maiores de oxigênio. Em um aspecto, portanto, os anaeróbios facultativos podem servir como células hospedeiras para qualquer uma das composições e/ou métodos aqui fornecidos e podem ser manipulados para produzir isopreno. As células hospedeiras anaeróbicas facultativas podem ser cultivadas sob condições substancialmente livres de oxigênio, sendo que a quantidade de oxigênio presente não é nociva para o crescimento, manutenção, e/ou fermentação dos anaeróbios, ou podem ser alternativamente cultivadas na presença de quantidades maiores de oxigênio.

[00231] A célula hospedeira pode, adicionalmente, ser uma célula fúngica filamentosa e sua progênie. (Consulte, por exemplo, Berka & Barnett, *Biotechnology Advances*, (1989), 7(2):127-154). Em alguns aspectos, a célula fúngica filamentosa pode ser qualquer uma de *Trichoderma longibrachiatum*, *T. viride*, *T. koningii*, *T. harzianum*, *Penicillium sp.*, *Humicola insolens*, *H. lanuginose*, *H. grisea*, *Chrysosporium sp.*, *C. lucknowense*, *Gliocladium sp.*, *Aspergillus sp.*, como *A. oryzae*, *A. niger*, *A sojae*, *A. japonicus*, *A. nidulans*, ou *A. awamori*, *Fusarium sp.*, como *F. roseum*, *F. graminum F. cerealis*, *F. oxysporuim*, ou *F. venenatum*, *Neurospora sp.*, como *N. crassa*, *Hypocrea sp.*, *Mucor sp.*, como *M. miehei*, *Rhizopus sp.* ou *Emericella sp.* Em alguns aspectos, o fungo é *A. nidulans*, *A. awamori*, *A. oryzae*, *A. aculeatus*, *A. niger*, *A. japonicus*, *T. reesei*, *T. viride*, *F. oxysporum*, ou *F. solani*. Em certas modalidades, os plasmídeos ou componentes plasmidiais para uso na presente invenção incluem aqueles descritos na publicação de patente US n° US 2011/0045563.

[00232] A célula hospedeira também pode ser uma levedura, como *Saccharomyces sp.*, *Schizosaccharomyces sp.*, *Pichia sp.*, ou Candida *sp*. Em alguns aspectos, a *Saccharomyces sp.* é *Saccharomyces cerevisiae* (consulte, por exemplo, Romanos *et al.*, 1992, *Yeast*, 8(6):423-488). Em certas modalidades, os plasmídeos ou componentes plasmidiais para uso na presente invenção incluem aqueles descritos na Patente US n° 7.659.097 e publicação de patente US n° US 2011/0045563.

[00233] A célula hospedeira pode, adicionalmente, ser uma espécie de algas, como uma alga verde, alga vermelha, glaucófitos, cloraracniófitos, euglenófitas, cromista, ou dinoflagelados. (consulte, por exemplo, Saunders & Warmbrodt, 1993, "*Gene Expression in Algae and Fungi*, *Including Yeast*," National Agricultural Library, Beltsville, MD, EUA). Em certas modalidades, os plasmídeos ou componentes

plasmidiais para uso na presente invenção incluem aqueles descritos na publicação de patente US n° US 2011/0045563. Em alguns aspectos, a célula hospedeira é uma cianobactéria, como uma cianobactéria classificada em quaisquer dos seguintes grupos, com base na morfologia: *Chlorococcales*, *Pleurocapsales*, *Oscillatoriales*, *Nostocales*, ou *Stigonematales* (consulte, por exemplo, Lindberg *et al.*, 2010, *Metab. Eng.* 12(1):70-79). Em certas modalidades, os plasmídeos ou componentes plasmidiais para uso na presente invenção incluem aqueles descritos nas publicações de patente US n°s US 2010/0297749; US 2009/0282545 e ped. pat. intern. n° WO 2011/034863.

[00234] Em alguns aspectos, células hospedeiras de *E. coli* podem ser usadas para expressar um ou mais de uma HMG-CoA redutase, uma isopreno sintase, um ácido nucleico da rota MVA (inclusive, por exemplo, da rota MVA não-tiolase), e/ou da rota DXP nas composições e métodos aqui descritos. Em um aspecto, a célula hospedeira é uma célula recombinante de uma cepa de Escherichia *coli* (*E. coli*), ou progênie da mesma, capaz de produzir mevalonato ou isopreno que expressa um ou mais ácidos nucleicos que codificam HMG-CoA redutase, isopreno sintase, um ácido nucleico da rota MVA (inclusive, por exemplo, da rota MVA não-tiolase), e/ou da rota DXP. As células hospedeiras de *E. coli* podem produzir mevalonato ou isopreno em quantidades, titulações de pico, e produtividades celulares maiores que aquelas das mesmas células sem um ou mais ácidos nucleicos expressos heterologamente que codificam HMG-CoA redutase, isopreno sintase, um ou mais ácidos nucleicos da rota MVA (inclusive, por exemplo, da rota MVA não-tiolase), e/ou uma ou mais da rota DXP. Além disso, o um ou mais ácidos nucleicos expressos heterologamente que codificam HMG-CoA redutase, isopreno sintase, um ou mais ácidos nucleicos da rota MVA (inclusive, por exemplo, da rota MVA não-tiolase), e/ou um ou mais da rota DXP em *E. coli* podem ser cópias cromossô-

micas (por exemplo, integradas ao cromossomo de *E. coli*). Em outros aspectos, as células de *E. coli* estão em cultura.

VETORES

[00235] Vetores adequados podem ser usados para qualquer uma das composições e métodos aqui descritos. Por exemplo, vetores adequados podem ser usados para otimizar a expressão de uma ou mais cópias de um gene que codifica uma HMG-CoA redutase, uma isopreno sintase, e/ou um ou mais polipeptídeos da rota MVA não-tiolase. Em algums aspectos, o vetor contém um marcador seletivo. Exemplos de marcadores seletivos incluem, mas não se limitam a, ácidos nucleicos de resistência a antibióticos (por exemplo, canamicina, ampicilina, carbenicilina, gentamicina, higromicina, fleomicina, bleomicina, neomicina, ou cloranfenicol) e/ou ácidos nucleicos que conferem uma vantagem metabólica, como uma vantagem nutricional, à célula hospedeira. Em alguns aspectos, uma ou mais cópias de HMG-CoA redutase, uma isopreno sintase, e/ou um ou mais ácidos nucleicos de polipeptídeos da rota MVA não-tiolase se integram ao genoma das células hospedeiras sem um marcador seletivo. Qualquer um dos vetores caracterizados ou usados nos Exemplos da presente descrição podem ser usados.

MÉTODOS DE TRANSFORMAÇÃO

[00236] Ácidos nucleicos que codificam acetoacetil-CoA sintase, uma enzima que produz acetoacetil-CoA sintase a partir de malonil-CoA e acetil-CoA, polipeptídeos da rota MVA não-tiolase, um polipeptídeo da rota MVA (inclusive Acetil-CoA acetil-transferase (AA-CoA tiolase), 3-hidróxi-3- metil glutaril-CoA sintase (HMG-CoA sintase), 3-Hidróxi-3-metil-glutaril-CoA redutase (HMG-CoA redutase), mevalonato quinase (MVK), Fosfomevalonato quinase (PMK), Difosfomevalonato descarboxilase (MVD), fosfomevalonato descarboxilase (PMDC) e/ou isopentenil fosfato quinase (IPK)), polipeptídeos da rota DXP, polipep-

tídeos de isopreno sintase, IDI, e qualquer outra enzima necessária para produzir isopreno podem ser introduzidos nas células hospedeiras (por exemplo, uma célula vegetal, uma célula fúngica, uma célula de levedura, ou uma célula bacteriana) por qualquer técnica conhecida de um versado na técnica.

[00237] Técnicas-padrão para introdução de um construto ou vetor de DNA em uma célula hospedeira, como transformação, eletroporação, microinjecção nuclear, transdução, transfecção (por exemplo, transfecção mediada por lipofecção ou mediada por DEAE-dextrina ou transfecção com o uso de um vírus fago recombinante), incubação com precipitado de DNA com fosfato de cálcio, bombardeamento de alta velocidade com microprojéteis revestidos de DNA, e fusão de protoplasto, podem ser usadas. As técnicas gerais de transformação são conhecidas na técnica (consulte, por exemplo, *Current Protocols in Molecular Biology* (F. M. Ausubel *et al.* (eds.) Capítulo 9, 1987; Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª ed., Cold Spring Harbor, 2001; and Campbell *et al.*, 1989, *Curr. Genet*. 16:53-56). Os ácidos nucleicos introduzidos podem ser integrados ao DNA cromossômico ou mantidos como sequências replicantes extracromossômicas. Os transformantes podem ser selecionados por qualquer método conhecido na técnica. Métodos adequados para a seleção de transformantes são descritos na publicação internacional n° WO 2009/076676, pedido de patente U.S. n° 12/335.071 (publicação de pedido de patente US n° 2009/0203102), WO 2010/003007, publicação de pedido de patente US n° 2010/0048964, WO 2009/132220, e publicação de pedido de patente US n° 2010/0003716.

[00238] Em uma modalidade, uma bactéria como *Escherichia coli* é usada como um hospedeiro. Nesta modalidade, um vetor de expressão pode ser selecionado e/ou manipulado para ser capaz de se replicar autonomamente nesta bactéria. Promotores, uma sequência de li-

gação ao ribossomo, sequência(s) de terminação de transcrição também podem ser incluídas no vetor de expressão, em adição aos genes aqui mencionados. Opcionalmente, um vetor de expressão pode conter um gene que controles a atividade do promotor.

[00239] Qualquer promotor pode ser usado contanto que ele possa ser expresso em um hospedeiro como Escherichia coli. Exemplos deste promotor que podem ser usados incluem um promotor trp, um promotor lac, um promotor PL, um promotor PR, e similares de Escherichia coli, e um promotor T7 de um fago. Adicionalmente, um promotor projetado artificialmente ou modificado como um promotor tac pode ser usado.

[00240] Um método para introdução de um vetor de expressão não é particularmente limitado, contanto que o DNA seja introduzido em uma bactéria por meio disso. Seus exemplos incluem um método que usa íons cálcio (Cohen, S. N., *et al.*, 1972, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, *USA*, 69:2110-2114) e um método de eletroporação.

[00241] Quando uma levedura é usada como um hospedeiro, Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe, Pichia pastoris, ou similares podem ser usados. Nesse caso, um promotor não é particularmente limitado contanto que ele possa ser expresso em levedura. Seus exemplos incluem um promotor gall, um promotor gal10, um promotor da proteína de choque térmico, um promotor MF.alfa.1, um promotor de PHO5, um promotor de PGK, um promotor de GAP, um promotor de ADH, e um promotor de AOX1.

[00242] Um método para introduzir um vetor recombinante em levedura não é particularmente limitado, contanto que DNA seja introduzido na levedura por meio dele. Seus exemplos incluem o método de eletroporação (Becker, D. M., *et al.* (1990) *Methods. Enzymol*., 194:182-187), o método de esferoplasto (Hinnen, A. et al., (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, *USA*, 75: 1929-1933), e o método de acetato de lítio (Itoh,

H.: (1983) *J. Bacteriol*., 153: 163-168).

MEIO DE CULTURA CELULAR EXEMPLIFICADOR

[00243] Como usado aqui, os termos "meio mínimo" ou "meios mínimos" referem-se a meio de cultura contendo o mínimo de nutrientes possível para proliferação celular, geralmente, porém nem sempre, sem a presença de um ou mais aminoácidos (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais aminoácidos). O meio mínimo contém, tipicamente: (1) uma fonte de carbono para proliferação bacteriana, (2) vários sais, que podem variar entre as espécies bacterianas e condições de cultivo; e (3) água. A fonte de carbono pode variar significativamente, desde açúcares simples como glicose até hidrolisados mais complexos de outras biomassas, como extrato de levedura, conforme discutido com mais detalhes abaixo. Os sais geralmente fornecem elementos essenciais como magnésio, nitrogênio, fósforo e enxofre, para permitir que as células sintetizem proteínas e ácidos nucleicos. O meio mínimo pode também ser suplementado com agentes seletivos, como antibióticos, para selecionar quanto à manutenção de certos plasmídeos e similares. Por exemplo, se um micro-organismo é resistente a um certo antibiótico, como ampicilina ou tetraciclina, então esse antibiótico pode ser adicionado ao meio para impedir a proliferação de células desprovidas de resistência. O meio pode ser suplementado com outros compostos, conforme necessário para selecionar quanto a características fisiológicas ou bioquímicas desejadas, como aminoácidos específicos e similares.

[00244] Qualquer formulação de meio mínimo pode ser usada para cultivar as células hospedeiras. As formulações de meio mínimo exemplificadoras incluem, por exemplo, o meio mínimo M9 e o meio mínimo TM3. Cada litro de meio mínimo M9 contém (1) 200 ml de sais M9 estéreis (64 g de Na_2HPO_4-$7H_2O$, 15 g de KH_2PO_4, 2,5 g de NaCl, e 5,0 g de NH_4Cl por litro); (2) 2 ml de 1 M $MgSO_4$ (estéril); (3) 20 ml

de 20% (p/v) de glicose (ou outra fonte de carbono), e (4) 100 µl de 1 M $CaCl_2$ (estéril). Cada litro de meio mínimo de TM3 contém (1) 13,6 g de K_2HPO_4; (2) 13,6 g KH_2PO_4; (3) 2 g $MgSO_4*7H_2O$; (4) 2 g de monoidrato de ácido cítrico, (5) 0,3 g de citrato férrico de amônio, (6) 3,2 g $(NH_4)_2SO_4$; (7) 0,2 g de extrato de levedura, e (8) 1 ml de solução de elementos-traço 1000X, o pH é ajustado para ~6,8 e a solução é esterilizado por filtração. Cada litro de elementos-traço 1000X contém: (1) 40 g de monoidrato de ácido cítrico, (2) 30 g de $MnSO_4*H_2O$; (3) 10 g de NaCl, (4) 1 g de $FeSO_4*7H_2O$; (4)1 g de $CoCl_2*6H_2O$; (5) 1 g de $ZnSO_4*7H_2O$; (6) 100 mg de $CuSO_4*5H_2O$; (7) 100 mg de H_3BO_3; e (8) 100 mg de $NaMoO_4*2H_2O$; o pH é ajustado para ~3,0.

[00245] Um meio mínimo adicional exemplificador inclui (1) fosfato de potássio K_2HPO_4, (2) sulfato de magnésio $MgSO_4$ * $7H_2O$, (3) monoidrato de ácido cítrico $C_6H_8O_7*H_2O$, (4) citrato férrico de amônio $NH_4FeC_6H_5O_7$, (5) extrato de levedura (junto à Biospringer), (6) solução de metais-traço modificada a 1000X, (7) ácido sulfúrico 50% p/v (peso por volume), (8) foamblast 882 (Emerald Performance Materials), e (9) 3,36 ml de solução salina macro. Todos os componentes são adicionados juntos e dissolvidos em H_2O desionizada e, em seguida, esterilizados a quente. Após resfriamento à temperatura ambiente, o pH é ajustado para 7,0 com hidróxido de amônio (28%) e q.s. para o volume. Solução de vitamina e espectinomicina são adicionadas após a esterilização e ajuste do pH.

[00246] Qualquer fonte de carbono pode ser usada para cultivar as células hospedeiras. O termo "fonte de carbono" refere-se a um ou mais compostos contendo carbono capazes de serem metabolizados por um organismo ou célula hospedeira. Por exemplo, o meio de células usado para cultivar as células hospedeiras pode incluir qualquer fonte de carbono adequada para manter a viabilidade ou crescimento das células hospedeiras. Em alguns aspectos, a fonte de carbono é

um carboidrato (como um monossacarídeo, dissacarídeo, oligossacarídeo ou polissacarídeo), ou açúcar invertido (por exemplo, xarope de sacarose enzimaticamente tratado). Em um aspecto, as células hospedeiras são inicialmente cultivadas em um meio (como um meio TM3) contendo D-xilose como uma fonte de carbono durante a fase de crescimento linear da fermentação. Em outro aspecto, a fonte de carbono é trocada de D-xilose para glicose quando as células hospedeiras alcançam a fase de produção de isopreno da fermentação.

[00247] Em alguns aspectos, a fonte de carbono inclui extrato de levedura ou um ou mais componentes de extrato de levedura. Em alguns aspectos, a concentração de extrato de levedura é de 0,1% (p/v), 0,09% (p/v), 0,08% (p/v), 0,07% (p/v), 0,06% (p/v), 0,05% (p/v), 0,04% (p/v), 0,03% (p/v), 0,02% (p/v) ou 0,01% (p/v) de extrato de levedura. Em alguns aspectos, a fonte de carbono inclui tanto extrato de levedura (ou um ou mais componentes do mesmo) como outra fonte de carbono, como glicose.

[00248] Monossacarídeos exemplificadores incluem glicose e frutose; oligossacarídeos exemplificador incluem lactose e sacarose, e polissacarídeos exemplificadores incluem amido e celulose. Carboidratos exemplificadores incluem açúcares C6 (por exemplo, frutose, manose, galactose ou glicose) e açúcares C5 (por exemplo, xilose ou arabinose).

[00249] Em alguns aspectos, as células aqui descritas são capazes de usar gás de síntese como uma fonte de energia e/ou carbono. Em algumas modalidades, o gás de síntese inclui pelo menos monóxido de carbono e hidrogênio. Em algumas modalidades, o gás de síntese inclui adicionalmente um ou mais dentre dióxido de carbono, água, ou nitrogênio. Em algumas modalidades, a razão molar entre hidrogênio e monóxido de carbono no gás de síntese é 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 3,0, 4,0,

5,0, ou 10,0. Em algumas modalidades, o gás de síntese compreende 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, ou 90%, em volume de monóxido de carbono. Em algumas modalidades, o gás de síntese compreende 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, ou 90%, em volume de hidrogênio. Em algumas modalidades, o gás de síntese compreende 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, ou 90%, em volume de dióxido de carbono. Em algumas modalidades, o gás de síntese compreende 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, ou 90%, em volume de água. Em algumas modalidades, o gás de síntese compreende 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, ou 90%, em volume de nitrogênio.

[00250] O gás de síntese pode ser derivado de fontes naturais ou sintéticas. A fonte a partir da qual o gás de síntese é derivado é chamada de "matéria prima." Em algumas modalidades, o gás de síntese é derivado de biomassa (por exemplo, madeira, gramíneas, resíduos agrícolas, dejetos municipais) ou carboidratos (por exemplo, açúcares). Em outras modalidades, o gás de síntese é derivado de hulha, petróleo, querogênio, areias asfálticas, xisto betuminoso, ou gás natural. Em outras modalidades, o gás de síntese é derivado de borracha, como pneus de borracha.

[00251] O gás de síntese pode ser derivado de uma matéria prima por uma variedade de processos, inclusive reforma de metano, liquefação de hulha, co-combustão, reações fermentativas, reações enzimátics, e gaseificação de biomassa. A gaseificação de biomassa é realizada por submeter a biomassa a uma oxidação parcial em um reator a temperaturas acima de cerca de 700 ℃ na pres ença de menos de uma quantidade estequiométrica de oxigênio. O oxigênio é introduzido no biorreator sob a forma de ar, oxigênio puro, ou vapor d´água. A gaseificação pode ocorrer em três etapas principais: 1) aquecimento inicial para secar qualquer umidade presente na biomassa; 2) pirólise, na qual a biomassa é aquecida até 300 a 500 ℃ na a usência d agen-

tes oxidantes para produzir gás, alcatrão, óleos e resíduo carbonizado sólido; e 3) gaseificação do material carbonizado sólido, alcatrão e gás para produzir os componentes principais do gás de síntese. A co-combustão é feita por gaseificação de uma mistura de hulha/biomassa. A composição do gás de síntese, como a identidade e as razões molares dos componentes do gás de síntese, podem variar dependendo da matéria prima a partir da qual ele é derivado e do método pelo qual a matéria prima é convertida em gás de síntese.

[00252] O gás de síntese pode conter impurezas, cuja natureza e quantidade variam de acordo com a matéria prima e com o processo usado na produção. Fermentações podem ser tolerantes a algumas impurezas, mas ainda há a necessidade de se remover do gás de síntese materiais como alcatrões e particulados que poderiam sujar o fermentador e equipamentos associados. Também é aconselhável remover compostos que poderiam contaminar o produto de isopreno, como compostos orgânicos voláteis, gases ácidos, metano, benzeno, tolueno, etil benzeno, xilenos, H_2S, COS, CS_2, HCl, O_3, compostos de organoenxofre, amônia, óxidos de nitrogênio, compostos orgânicos contendo nitrogênio, e vapores de metal pesado. A remoção de impurezas do gás de síntese pode ser obtida por um de vários meios, inclusive purificação com uso de gás, tratamento com adsorventes em fase sólida, e purificação usando membranas permeáveis a gás.

CONDIÇÕES DE CULTURA CELULAR EXEMPLIFICADORAS

[00253] Os materiais e métodos adequados para a manutenção e a proliferação das células recombinantes da invenção são descritos abaixo, por exemplo na seção Exemplos. Outros materiais e métodos adequados para a manutenção e o crescimento de culturas bacterianas são bem conhecidos na técnica. Técnicas exemplares podem ser encontradas na publicação internacional n° WO 2009/ 076676, pedido de patente US n° 12/335.071 (publicação US n° 2009/ 0203102), WO

2010/003007, publicação US n° 2010/0048964, WO 2009/132220, publicação US n° 2010/0003716, *Manual of Methods for General Bacteriology* Gerhardt *et al.*, *eds*), American Society for Microbiology, Washington, DC, EUA (1994) ou Brock in *Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology*, Segunda Edição (1989) Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA, EUA. Em alguns aspectos, as células são cultivadas em um meio de cultura sob condições que permitem a expressão de uma ou mais isopreno sintases, um ou mais polipeptídeos da rota DXP, um ou mais polipeptídeos da rota MVA, IDI, ou polipeptídeos de PGL codificados por um ácido nucleico inserido nas células hospedeiras.

[00254] As condições-padrão para cultura celular podem ser usadas para cultivar as células (consulte, por exemplo, WO 2004/033646 e as referências ali citadas). Em alguns aspectos, as células cultivadas e mantidas a uma temperatura, mistura gasosa, e pH adequados (como em cerca de 20℃ a cerca de 37℃, em cerca de 6% a cerca de 84% de CO_2, e em um pH entre cerca de 5 a cerca de 9). Em alguns aspectos, as células cultivadas a 35℃ em um meio celular adequado. Em alguns aspectos, as faixas de pH para fermentação estão entre cerca de pH 5,0 e cerca de pH 9,0 (como de cerca de pH 6,0 a cerca de pH 8,0 ou de cerca de 6,5 a cerca de 7,0). As células podem ser cultivadas sob condições aeróbicas, anóxicas, ou anaeróbicas com base nas exigências das células hospedeiras. Além disso, as condições de cultura celular mais específicas podem ser usadas para cultivar as células. Por exemplo, em algumas modalidades, as células recombinantes (por exemplo, bacterianas) expressam um ou mais ácidos nucleicos heterólogos que codificam qualquer um dos ácidos nucleicos aqui descritos (por exemplo, uma HMG-CoA redutase, uma isopreno sintase, uma enzima da rota MVA, e/ou uma enzima da rota DXP) sob o controle de um promotor forte em um plasmídeo com número de cópias baixo a

médio e são cultivadas a 34℃.

[00255] As condições de cultura e os modos de fermentação convencionais, como fermentação em batelada, batelada alimentada, ou contínua que podem ser usados são descritos na publicação internacional n° WO 2009/076676, pedido de patente US n° 1 2/335.071 (publicação US n° 2009/0203102), WO 2010/003007, publi cação US n° 2010/0048964, WO 2009/132220, publicação US n° 2010 /0003716. As fermentações em batelada e batelada alimentada são comuns e bem conhecidas na técnica e exemplos podem ser encontrados em Brock, Biotechnology: *A Textbook of Industrial Microbiology*, Segunda Edição (1989) Sinauer Associates, Inc.

[00256] Em alguns aspectos, as células são cultivadas sob condições de glicose limitada. O termo "condições de glicose limitada" significa que a quantidade de glicose que é adicionada é menor que, ou de cerca de, 105% (como cerca de 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20% ou 10%) da quantidade de glicose que é consumida pelas células. Em aspectos específicos, a quantidade de glicose que é adicionada ao meio de cultura é aproximadamente igual à quantidade de glicose que é consumida pelas células durante um período de tempo específico. Em alguns aspectos, a taxa de proliferação celular é controlada mediante a limitação da quantidade de glicose adicionada, de modo que as células proliferem à velocidade que pode ser suportada pela quantidade de glicose presente no meio celular. Em alguns aspectos, a glicose não se acumula durante o tempo em que as células são cultivadas. Em vários aspectos, as células são cultivadas sob condições de glicose limitada durante mais que, ou cerca de, 1, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60 ou 70 horas. Em vários aspectos, as células são cultivadas sob condições de glicose limitada durante mais que, ou cerca de, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95 ou 100% do total do tempo durante o qual as células são cultivadas.

Sem se ater a qualquer teoria específica, acredita-se que condições de glicose limitadas possam permitir uma regulação mais favorável das células.

[00257] Em alguns aspectos as células recombinantes (por exemplo, bacterianas) são cultivadas em cultura em batelada. As células recombinantes também podem ser cultivadas em cultura de batelada alimentada ou em cultura contínua. Adicionalmente, as células recombinantes podem ser cultivadas em meio mínimo, incluindo, mas não se limitando a, qualquer um dos meios mínimos descritos acima. O meio mínimo pode ser ainda suplementado com 1,0% (p/v) de glicose, ou quaisquer outros açúcares com seis carbonos ou menos. Especificamente, o meio mínimo pode ser suplementado com 1% (p/v), 0,9% (p/v), 0,8% (p/v), 0,7% (p/v), 0,6% (p/v), 0,5% (p/v), 0,4% (p/v), 0,3% (p/v), 0,2% (p/v), ou 0,1% (p/v) de glicose. Adicionalmente, o meio mínimo pode ser suplementado com 0,1% (p/v) ou menos extrato de levedura. Especificamente, o meio mínimo pode ser suplementado com 0,1% (p/v), 0,09% (p/v), 0,08% (p/v), 0,07% (p/v), 0,06% (p/v), 0,05% (p/v), 0,04% (p/v), 0,03% (p/v), 0,02% (p/v), ou 0,01% (p/v) de extrato de levedura. Alternativamente, o meio mínimo pode ser suplementado com 1% (p/v), 0,9% (p/v), 0,8% (p/v), 0,7% (p/v), 0,6% (p/v), 0,5% (p/v), 0,4% (p/v), 0,3% (p/v), 0,2% (p/v), ou 0,1% (p/v) de glicose e com 0,1% (p/v), 0,09% (p/v), 0,08% (p/v), 0,07% (p/v), 0,06% (p/v), 0,05% (p/v), 0,04% (p/v), 0,03% (p/v), 0,02% (p/v), ou 0,01% (p/v) de extrato de levedura.

[00258] Em alguns aspectos, as células recombinantes são cultivadas sob condições de baixo teor de oxigênio. Em outros aspectos, as células recombinantes (por exemplo, bacterianas) são cultivadas sob condições atmosféricas que compreendem qualquer um de cerca de 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, ou 15%, inclusive, inclusive quaisquer valores entre estas porcentagens, de oxigênio.

Em outros aspectos, as células recombinantes são cultivadas sob condições atmosféricas compreendendo qualquer um de cerca de 3 a 8%, 3,5 a 8,5%, 4 a 9%, 4,5 a 9,5%, 5 a 10%, 5,5 a 10,5%, 6 a 11%, ou 6,5 a 11,5% de oxigênio.

MÉTODOS DE USO DE CÉLULAS RECOMBINANTES PARA PRODUZIR ISOPRENO

[00259] São aqui fornecidos métodos de produzir isopreno por cultivo de qualquer uma das células recombinantes aqui descritas sob condições como aquelas aqui apresentadas. Em um aspecto, o isopreno pode ser produzido mediante cultivo de células recombinantes compreendendo um gene *ispA* que tem atividade funcional diminuída e um ou mais ácidos nucleicos que codificam: (a) um polipeptídeo de isopreno sintase, sendo que o polipeptídeo de isopreno sintase é codificado por um ácido nucleico heterólogo; e (b) um ou mais polipeptídeos da via do mevalonato (MVA). Em um aspecto, um ou mais ácidos nucleicos heterólogos que codificam uma HMG-CoA redutase, uma polipeptídeo da rota inferior de MVA, e um polipeptídeo de isopreno sintase podem ser usados. Em outro aspecto, o isopreno pode ser produzido mediante cultivo de células recombinantes compreendendo um ou mais ácidos nucleicos heterólogos que codificam uma HMG-CoA redutase e HMG-CoA sintase, um polipeptídeo da rota inferior de MVA, e um polipeptídeo de isopreno sintase. Em ainda um outro aspecto, um ou mais ácidos nucleicos heterólogos que codificam um ou mais polipeptídeos da rota superior de MVA, um ou mais polipeptídeos da rota inferior de MVA, e/ou um ou mais polipeptídeos da rota DXP podem ser usados. Em alguns aspectos, as células recombinantes aqui descritas mostram qualquer um de cerca de 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 95%, ou 100%, inclusive, incluindo qualquer valor entre estas porcentagens, de produção aumentada de isopreno em comparação a células que

não compreendem um IspA que tem atividade funcional diminuída. O isopreno pode ser produzido a partir de qualquer uma das células descritas aqui e de acordo com qualquer um dos métodos descritos aqui. Qualquer uma das células pode ser usada com o propósito de produzir isopreno a partir de carboidratos, incluindo açúcares com seis carbonos como glicose.

[00260] As células podem compreender adicionalmente uma ou mais moléculas de ácido nucleico que codificam o(s) polipeptídeo(s) da rota inferior de MVA descrito(s) acima (por exemplo, MVK, PMK, MVD, e/ou IDI), qualquer um dos polipeptídeos das rotas de MVA superiores descritos acima (por exemplo, uma tiolase, uma acetoacetil-CoA sintase, uma HMG-CoA redutase, e/ou uma HMG-CoA sintase) e/ou qualquer um dos polipeptídeos de isopreno sintase descritos acima (por exemplo, isopreno sintase de *P. alba*). Em alguns aspectos, as células recombinantes (por exemplo, bacterianas) podem ser qualquer uma das células aqui descritas. Qualquer uma das isopreno sintases ou variantes das mesmas aqui descritas, qualquer uma das cepas bacterianas aqui descritas, qualquer um dos promotores aqui descritos, e/ou qualquer um dos vetores aqui descritos podem também ser usados para produzir isopreno com o uso de qualquer uma das fontes de energia (por exemplo, glicose ou qualquer outro açúcar de seis carbonos) aqui descritas. Em alguns aspectos, o método para produção de isopreno compreende, ainda, uma etapa de recuperar o isopreno.

[00261] Em alguns aspectos, a quantidade de isopreno produzida é medida no ponto de tempo de produtividade. Em alguns aspectos, a produtividade para as células é de cerca de qualquer uma das quantidades de isopreno reveladas na presente invenção. Em alguns aspectos, a quantidade total cumulativa de isopreno produzida é medida. Em alguns aspectos, a produtividade total cumulativa para as células é de cerca de qualquer uma das quantidades de isopreno reveladas na pre-

sente invenção.

[00262] Em alguns aspectos, qualquer uma das células descritas aqui (por exemplo, as células em cultura) produz isopreno em mais que cerca de qualquer de, ou cerca de qualquer de 1, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000, 1.250, 1.500, 1.750, 2.000, 2.500, 3.000, 4.000, 5.000, ou mais nmol de isopreno/grama de células para o peso úmido de células/hora (nmol/g_{wcm}/h). Em alguns aspectos, a quantidade de isopreno está entre cerca de 2 a cerca de 5.000 nmol/g_{wcm}/h, como entre cerca de 2 a cerca de 100 nmol/g_{wcm}/h, cerca de 100 a cerca de 500 nmol/g_{wcm}/h, cerca de 150 a cerca de 500 nmol/g_{wcm} /h, cerca de 500 a cerca de 1.000 nmol/g_{wcm}/h, cerca de 1.000 a cerca de 2.000 nmol/g_{wcm}/h, ou cerca de 2.000 a cerca de 5.000 nmol/g_{wcm}/h. Em alguns aspectos, a quantidade de isopreno está entre cerca de 20 a cerca de 5.000 nmol/g_{wcm}/h, cerca de 100 a cerca de 5.000 nmol/g_{wcm}/h, cerca de 200 a cerca de 2.000 nmol/g_{wcm}/h, cerca de 200 a cerca de 1.000 nmol/g_{wcm}/h, cerca de 300 a cerca de 1.000 nmol/g_{wcm}/h, ou cerca de 400 a cerca de 1.000 nmol/g_{wcm}/h.

[00263] Em alguns aspectos, as células em cultura produzem isopreno em mais que ou cerca de 1, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000, 1.250, 1.500, 1.750, 2.000, 2.500, 3.000, 4.000, 5.000, 10.000, 100.000, ou mais ng de isopreno/grama de células para o peso molecular das células/h (ng/g_{wcm}/h). Em alguns aspectos, a quantidade de isopreno está entre cerca de 2 a cerca de 5.000 ng/g_{wcm}/h, como entre cerca de 2 a cerca de 100 ng/g_{wcm}/h, cerca de 100 a cerca de 500 ng/g_{wcm}/h, cerca de 500 a cerca de 1.000 ng/g_{wcm}/h, cerca de 1.000 a cerca de 2.000 ng/g_{wcm}/h, ou cerca de 2.000 a cerca de 5.000 ng/g_{wcm}/h. Em alguns aspectos, a quantidade de isopreno está entre cerca de 20 a cerca de 5.000 ng/g_{wcm}/h, cerca de 100 a cerca de 5.000 ng/g_{wcm}/h, cerca de 200 a cerca de 2.000

ng/g_{wcm}/h, cerca de 200 a cerca de 1.000 ng/g_{wcm}/h, cerca de 300 a cerca de 1.000 ng/g_{wcm}/h, ou cerca de 400 a cerca de 1.000 ng/g_{wcm}/h.

[00264] Em alguns aspectos, as células em cultura produzem uma titulação cumulativa (quantidade total) de isopreno em mais que cerca de qualquer de, ou cerca de qualquer de 1, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000, 1.250, 1.500, 1.750, 2.000, 2.500, 3.000, 4.000, 5.000, 10.000, 50.000, 100.000, ou mais mg de isopreno/L de caldo (mg/L_{caldo}, sendo que o volume de caldo inclui o volume das células e o meio celular). Em alguns aspectos, a quantidade de isopreno está entre cerca de 2 a cerca de 5.000 mg/L_{caldo}, como entre cerca de 2 a cerca de 100 mg/L_{caldo}, cerca de 100 a cerca de 500 mg/L_{caldo}, cerca de 500 a cerca de 1.000 mg/L_{caldo}, cerca de 1.000 a cerca de 2.000 mg/L_{caldo}, ou cerca de 2.000 a cerca de 5.000 mg/L_{caldo}. Em alguns aspectos, a quantidade de isopreno está entre cerca de 20 a cerca de 5.000 mg/L_{caldo}, cerca de 100 a cerca de 5.000 mg/L_{caldo}, cerca de 200 a cerca de 2.000 mg/L_{caldo}, cerca de 200 a cerca de 1.000 mg/L_{caldo}, cerca de 300 a cerca de 1.000 mg/L_{caldo}, ou cerca de 400 a cerca de 1.000 mg/L_{caldo}.

[00265] Em alguns aspectos, o isopreno produzido pelas células in cultura (como qualquer uma das células recombinantes aqui descritas) compreende ao menos cerca de 1, 2, 5, 10, 15, 20, ou 25%, em volume do efluente gasoso de fermentação. Em alguns aspectos, o isopreno compreende entre cerca de 1 a cerca de 25% por volume de efluente gasoso, como entre cerca de 5 a cerca de 15 %, cerca de 15 a cerca de 25%, cerca de 10 a cerca de 20%, ou cerca de 1 a cerca de 10 %.

[00266] Em alguns aspectos, as células na cultura (como qualquer uma das células recombinantes aqui descritas) produzem qualquer um dentre cerca de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, ou 100%, in-

clusive, incluindo quaisquer percentages entre estes valores, maior produtividade cumulativa de isopreno em glicose em comparação a células que não compreendem atividade funcional de IspA diminuída. Em outro aspecto, as células na cultura (como qualquer uma das células recombinantes aqui descritas) produzem qualquer um dentre cerca de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, ou 100%, inclusive, incluindo quaisquer percentages entre estes valores, maior produtividade isopreno em comparação às células que não compreendem atividade funcional de IspA diminuída. Em outros aspectos, as células na cultura (como qualquer uma das células recombinantes aqui descritas) produzem qualquer um dentre cerca de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, ou 100%, inclusive, incluindo quaisquer percentages entre estes valores, maior produtividade específica de pico de isopreno em comparação às células que não compreendem atividade funcional de IspA diminuída. Em alguns aspectos, as células na cultura (como qualquer uma das células recombinantes aqui descritas) produzem qualquer um dentre cerca de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, ou 100%, inclusive, incluindo quaisquer percentages entre estes valores, maior índice de produtividade celular de isopreno em comparação às células que não compreendem atividade funcional de IspA diminuída.

MÉTODOS DE PURIFICAÇÃO EXEMPLIFICADORES

[00267] Em alguns aspectos, qualquer um dos métodos aqui descritos inclui, ainda, uma etapa de recuperar o isopreno produzido por qualquer uma das células recombinantes aqui apresentadas. Em alguns aspectos, o isopreno é recuperado por extração por absorção (consulte, por exemplo, a publicação US n° 2011/017 8261 A1). Em alguns aspectos, qualquer dos métodos aqui descritos inclui, ainda, uma

etapa de recuperação do polipeptídeo heterólogo.

[00268] Os métodos de purificação adequados são descritos com mais detalhes na publicação do US n°US2010/0196977 A1.

[00269] Ao longo deste relatório descritivo, várias patentes, pedidos de patentes e outros tipos de publicações (por exemplo, artigos de revistas) são referenciados. A revelação de todas as patentes, pedidos de patente e publicações aqui citadas está incorporada aqui por referência na sua totalidade para todos os fins.

[00270] A invenção pode ser adicionalmente compreendida mediante referência aos exemplos a seguir, que são fornecidos a título de ilustração e se destinam a ser uma limitação.

EXEMPLOS

[00271] Informações gerais

TABELA 1: Cepas usadas

Nome da cepa	Genótipo	Progenitor	plasmídeos
CMP451	BL21 pgl PL.2mKKDyI GI 1.2 gltA		Nenhum
CMP457	BL21 pgl+ PL.2 mKKDyI GI1.2 gltA, p-Trc(MEA)alba_mMVK, pCLPtrcUpper_Efaecalis	CMP451	pDW34, MCM82
CMP596	BL21 pgl PL.2mKKDyI GI 1.2 gltA ldhA::Kan	CMP451	Nenhum
CMP722	BL21 pgl PL.2mKKDyI GI 1.2 gltA ldhA	CMP596	Nenhum
CMP876	BL21 pgl PL.2mK*KDyI GI 1.2 gltA ldhA	CMP451	Nenhum
CMP882	BL21 pgl PL.2mKKDyI GI 1.2 gltA, pTrcHis2B, p-CL1920	CMP451	

Nome da cepa	Genótipo	Progenitor	plasmídeos
CMP884	BL21 pgl PL.2mK*KDyI GI 1.2 gltA, pTrcHis2B, p-CL1920	CMP451	
CMP981	BL21 pgl PL.2mKKDyI GI1.2gltA yhfSpKD3IspAyhfS	CMP451	Nenhum
CMP992	BL21 pgl PL.2mKKDyI GI1.2gltA yhfSFRTIspA-yhfS	CMP981	Nenhum
CMP1018	BL21 pgl PL.2mKKDyI GI 1.2 gltA ldhA::Kan	CMP451	Nenhum
CMP1024	BL21 pgl PL.2mKKDyI GI 1.2 gltA ldhA Cm::ispA-etiqueta proteolítica	CMP992	Nenhum
CMP1030	BL21 pgl PL.2mKKDyI GI1.2gltA yhfSFRTIspA-yhfS thiFRTtrunclspA	CMP1018	Nenhum
CMP1034	BL21 pgl PL.2mKKDyI GI 1.2 gltA ldhA ispA-etiqueta proteolítica	CMP1024	Nenhum
CMP1059	BL21 pgl PL.2mKKDyI GI 1.2 gltA ldhA ispA-etiqueta proteolítica, pCLPtrcUp-per, pTrc(variante ME-A)alba mMVK	CMP1034	MCM82, pCHL243
CMP1061	BL21 pgl PL.2mKKDyI GI1.2gltA yhfSFRTIspA-yhfS thiFRT3trunclspA, pCLPtrcUpper, p-Trc(variante MEA)alba mMVK	CMP1030	MCM82, pCHL243

Nome da cepa	Genótipo	Progenitor	plasmídeos
CMP1067	BL21 pgl PL.2mKKDyI GI1.2gltA yhfSpKD4PyddVIspAyhfS thipKD3truncIspA	CMP1018	Nenhum
CMP1075	BL21 pgl PL.2mKKDyI GI1.2gltA yhfSFRTPydd-VIspAyhfS thiFRTtruncIs-pA	CMP1067	Nenhum
CMP1082	BL21 pgl PL.2mKKDyI GI1.2gltA yhfSFRTPydd-VIspAyhfS thiFRTtruncIs-pA, pCLPtrcUp-per_Efaecalis, p-Trc(variante MEA)alba mMVK	CMP1075	MCM82, pCHL243
CMP1101	BL21 pgl PL.2mKKDyI GI1.2gltA yhfSFRTIspA-yhfS thipKD3truncIspA yhfS-pKD4-PispA_avianA166W	CMP1018	Nenhum
CMP1102	BL21 pgl PL.2mKKDyI GI1.2gltA yhfSFRTIspA-yhfS thipKD3truncIspA yhfS-pKD4-PispA_avianN144'W	CMP1018	Nenhum
CMP1107	BL21 pgl PL.2mKKDyI GI1.2gltA yhfSFRTIspA-yhfS thipKD3truncIspA yhfS-FRT-PispA_avianA166W	CMP1101	Nenhum
CMP1108	BL21 pgl PL.2mKKDyI GI1.2gltA yhfSFRTIspA-yhfS thipKD3truncIspA yhfS-FRT-PispA_avianN144'W	CMP1102	Nenhum

Nome da cepa	Genótipo	Progenitor	plasmídeos
CMP1112	BL21 pgl PL.2mKKDyI GI1.2gltA yhfSFRTIspA-yhfS thipKD3truncIspA yhfS-FRT-PispA_avianA166W, p-CLPtrcUpper_Efaecalis, pTrc(MEA variant)alba mMVK	CMP1107	MCM82, pCHL243
CMP1113	BL21 pgl PL.2mKKDyI GI1.2gltA yhfSFRTIspA-yhfS thipKD3truncIspA yhfS-FRT-PispA_avianN144'W, p-CLPtrcUpper_Efaecalis, pTrc(variante MEA)alba mMVK	CMP1108	MCM82, pCHL243
CMP1125	BL21 pgl::Kan PL.2mKKDyI GI1.2gltA yhfSFRTPyddVIspAyhfS thiFRTtruncIspA	CMP1075	Nenhum
CMP1133	BL21 Δpgl PL.2mKKDyI GI1.2gltA yhfSFRTPydd-VIspAyhfS thiFRTtruncIs-pA	CMP1125	Nenhum
CMP1136	BL21 Δpgl PL.2mKKDyI GI1.2gltA yhfSFRTPydd-VIspAyhfS thiFRTtruncIs-pA, pCLPtrcUp-per_Efaecalis, p-Trc(variante MEA)alba mMVK	CMP1133	MCM82, pCHL243
MCM1020	BL21 t pgl, pTrcHis2B, pCL1920	CMP258	pTrcHis2B, pCL1920

Exemplo 1: O aumento do fluxo de carbono para a rota isoprenoide afeta a viabilidade celular

[00272] De modo a investigar os efeitos do aumento do fluxo de carbono através da rota isoprenoide em *E. coli*, duas cepas transportando a rota inferior de MVA integrada no cromossomo, CMP882 (HMB gi1.2 gltA + pTrcHis2B + pCL1920) e CMP884 (HMB GI1.2 gltA desenvolvido, pTrcHis2B, pCL1920 (MVK inativo)) foram cultivadas sob condições de batelada alimentada. A cepa CMP884 continha uma mutação pontual no gene da mevalonato quinase (MVK) fazendo com que a enzima fosse inativa, o que, de fato, impede o fluxo de carbono através da rota inferior de MVA. O mevalonato foi alimentado aos fermentadores e a concentração de mevalonato foi medida no meio.

MÉTODOS

[00273] **Receita do meio** (por litro do meio de fermentação): 7,5 g de K2HPO4, 2 g de MgSO4 * 7H2O, 2 g de monoidrato de ácido cítrico, 0,3 g de citrato férrico de amônio, 0,5 g de extrato de levedura, 1,6 mL de ácido sulfúrico a 50%, 1 ml de solução metais-traço modificada a 1.000X. Todos os componentes foram adicionados em conjunto e dissolvidos em água desionizada. Esta solução foi esterilizada com aquecimento (123℃ por 20 minutos). O pH foi ajustado p ara 7,0 com hidróxido de amônio (28%) e completado para o volume. 10 g de glicose, 8 mL de solução de vitamina, e antibióticos foram adicionados após a esterilização e o ajuste de pH.

[00274] **Solução de metais-traço modificada a 1000X** (por litro): 40 g de Ácidos cítricos * H2O, 30 g de MnSO4 * H2O, 10 g de NaCl, 1 g de FeSO4 * 7H2O, 1 g de CoCl2 * 6H2O, 1 g de ZnSO * 7H2O, 100 mg de CuSO4 * 5H2O, 100 mg de H3BO3, 100 mg de NaMoO4 * 2H2O. Cada componente foi dissolvido um por vez em água desionizada, o pH foi ajustado em 3,0 com HCl/NaOH, e, então, a solução foi levada ao volume e esterilizada por filtro com um filtro de 0,22 mícron.

[00275] **Solução de vitamina** (por litro): 1,0 g de cloridrato de tiamina, 1,0 g de D-(+)-biotina, 1,0 g de ácido nicotínico, 4,0 g de cloridra-

to de piridoxina. Cada componente foi dissolvido um por vez em água desionizada, o pH foi ajustado em 3,0 com HCl/NaOH, e, então, a solução foi levada ao volume e esterilizada por filtro com filtro de 0,22 mícron.

[00276] **Solução salina macro** (por litro): 296 g de MgSO4 * 7H2O, 296 g de monoidrato de ácido cítrico, 49,6 g de citrato férrico de amônio. Todos os componentes foram dissolvidos em água, levados para o volume e esterilizados por filtração com filtro de 0,22 mícron.

[00277] **Solução de alimentação** (por quilograma): 0,590 kg de glicose, 0,393 kg de água desionizada, 7,4 g de K2HPO4, e 8,9 g de Foamblast882 100%. Todos os componentes foram misturados juntos e autoclavados. Após autoclavagem da solução de alimentação, os suplementos de nutrientes são adicionados ao tubo de alimentação em uma capela estéril. As adições pós-esterilização à alimentação são (por quilograma de solução de alimentação), 5,54 ml de solução salina macro, 6,55 ml de solução de vitamina, 0,82 ml de solução de metais-traço modificada a 1.000X.

[00278] **Alimentação de ácido mevalônico**: Uma fonte purificada e concentrada de ácido mevalônico foi diluída com água deionizada para produzir uma concentração final de aproximadamente 60 g/L. A solução foi esterilizada por filtração com um filtro de 0,22 mícron e derramada em um frasco de alimentação.

[00279] Este experimento foi realizado para monitorar a formação de isopreno a partir de glicose no pH de fermentação (7,0) e temperatura (34℃) desejados. Um frasco congelado da cepa de *E. coli* foi descongelado e inoculado em um frasco com meio de triptona-extrato de levedura e os antibióticos adequados. Depois que inóculo cresceu para a densidade óptica 1,0, medida a 550 nm (OD_{550}), 500 ml foram usados para inocular um biorreator de 15 L e levar o volume do inicial do tanque para 5 L.

[00280] Os meios de batelada tinham glicose em batelada a 9,7 g/L. A indução foi realizada pela adição de isopropil-beta-D-1-tiogalactopiranosida (IPTG). IPTG foi adicionada ao tanque para levar a concentração para 200 µM quando as células estavam em uma OD_{550} de 6. A alimentação de ácido mevalônico foi colocada no fermentador de forma contínua a uma taxa igual à TCER (taxa total de evolução de dióxido de carbono, mmol CO_2/h) dividido por 3.000 com unidades finais de g de alimentação/min. A exaustão da glicose, conforme sinalizado por uma elevação no pH, foi usada para a alimentação de uma solução de alimentação de glicose suplementar para satisfazer as demandas metabólicas em taxas menores que ou iguais a 10 g/min.

[00281] O CMP882 foi construído por eletroporação concomitante de pTrcHis2B (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e pCL1920 (consulte a publicação U.S. n° US2009/0203102) em CMP451. Uma colônia que cresce em LB + 50 mg/L de carbenicilina e 50 mg/L de espectinomicina foi selecionada e denominada CMP882. CMP876 é homóloga a CMP451 exceto por uma mutação na mevalonato quinase cromossômica que torna a enzima inativa. Os plasmídeos pTrcHis2B e pCL1920 foram concomitantemente eletroporados em CMP876. Uma colônia que cresce em LB + 50 mg/L de carbenicilina e 50 mg/L de espectinomicina foi selecionada e denominada CMP884.

[00282] Análise do potencial de membrana foi usada para avaliar a viabilidade das bactérias durante a fermentação. Caldo do fermentador foi recolhido e imediatamente diluído 150 vezes em tampão PBS. As células foram então diluídas adicionalmente 150 vezes em tampão de PBS contendo 1 µM de bis-(ácido 1,3-dibutilbarbitúrico)trimetina oxonol $DiBAC_4(3)$, (Invitrogen, cat. N° B-438). As amostras foram deixadas corar durante 10 minutos antes da quantificação por fluorescência verde ao nível de uma única célula usando citometria de fluxo (FACSCalibur,

Becton Dickinson). Um comprimento de onda de excitação de 488 nm e um comprimento de onda de emissão de 530 nm foram usados. Inicialmente, uma cultura em crescimento exponencial e uma cultura de *E. coli* BL21 morta pelo calor foram coradas com $DiBAC_4(3)$ para determinar os níveis de fluorescência verde das células saudáveis e mortas respectivamente. Estas informações foram usadas para criar janelas de seleção para analisar os dados de citometria de fluxo para determinar a fração de células com o potencial de membrana intacto e a fração de células sem potencial de membrana. Os dados também foram selecionados no tamanho da célula apropriado (dispersão frontal versus dispersão lateral medida a 488 nm) para identificar somente as bactérias intactas. O nível de fluorescência verde das células que passam nestes critérios foi então usado para determinar a fração de células com um potencial de membrana saudável e a fração de células sem potencial de membrana nas amostras de fermentação. As células com potencial de membrana intacto foram assumidas como estando vivas e metabolicamente ativas, enquanto as células sem potencial de membrana foram consideradas mortas e metabolicamente inativas.

RESULTADOS

[00283] Os resultados do presente experimento são mostrados na **Figura 1** a **Figura 4**. A presença de uma enzima MVK inativa em células alimentadas com mevalonato mostrou afetar significativamente a viabilidade do organismo. Conforme mostrado na **Figura 1b**, o mevalonato foi absorvido de forma bem sucedida pelas células contendo o MVK ativo enquanto ocorreu acúmulo de mevalonato no meio na linhagem celular com MVK inativo, CMP884. Esta captação resulta em um aumento do fluxo de carbono através de IspA para a rota isoprenoide, conforme indicado pelos níveis aumentados de farnesil pirofosfato mostrados na **figura 2**. A cepa com uma enzima mevalonato quinase inativa não acumularam farnesil pirofosfato. A análise do poten-

cial de membrana mostrou as linhagens celulares com MVK inativo mantendo um alta percentual de viabilidade celular durante a alimentação com mevalonato enquanto que células com MVK ativo mostraram um declínio na viabilidade celular (**Figura 3**). A taxa de evolução de carbono (CER) das duas linhagens celulares também foi alterado, *veja a* **Figura 4**. Quando as fermentações alcançaram a fase estacionária, a taxa de respiração (isto é, emissão de CO_2) da cepa com MVK ativo caiu rapidamente. Em contrapartida, a cepa com a rota MVA inativa mostrou um declínio muito mais lento na taxa de respiração. Estes resultados indicam que o aumento do fluxo isoprenoide pode ser prejudicial para *E. coli*, e sugerem que a atividade diminuída de ispA pode ser benéfica para a viabilidade de cepas de *E. coli* com fluxo aumentado para DMAPP e IPP.

Exemplo 2: Utilização de uma etiqueta proteolítica para controlar a atividade da proteína IspA

[00284] Para otimizar os níveis intracelulares de FPP e DMAPP em cepas para produção de isopreno, uma fusão traducional entre FPP sintase (IspA) e uma etiqueta proteolítica foi gerada. A etiqueta proteolítica de tmRNA (Andersen *et al.*, 1998, *Appl Environ Microbiol.*, 64(6), 2240-2246) direciona IspA para degradação nas células hospedeiras.

MÉTODOS

[00285] Uma etiqueta proteolítica de tmRNA de 11 aminoácidos foi fundida à terminação C de IspA usando o sistema de recombinação Red/ET de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante (Gene Bridges). Resumidamente, o cassete de inserção Gene Bridges que codifica resistência ao cloranfenicol foi amplificado por PCR usando os iniciadores "GBIspACtmRNA-ASV-For" e "GBisp2" (*veja* **tabela 2**). O cassete foi, então, introduzido em *E. coli* BL21 DE3 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante, e colônias resistentes ao cloranfenicol foram selecionadas para va-

lidação. A integração correta do cassete de inserção foi verificada por PCR usando os iniciadores "ispTest1" e "GBprimer2" (*vide* **tabela 2**). Uma cepa validada, MD08-97, que apresentou um produto de PCR com o tamanho adequado, foi selecionada para análise posterior.

[00286] A rota inferior do ácido mevalônico no vetor pTrcKanKKDIy (*vide* Pub. U.S. n° 2009/0203102) foi transformada usando práticas-padrão de biologia molecular em BL21 DE3, como um controle, e em MD08-97, para produzir as cepas DW141 e DW142, respectivamente. As cepas foram cultivadas nos antibióticos adequados em meio TM3 para a fase exponencial precoce, e então induzidas com 500 µm de IPTG e tratadas com 5 mM de ácido mevalônico por aproximadamente 2 a 3 horas. As culturas foram coletadas em um volume igual de metanol frio antes da análise de metabólitos. A análise de metabólitos foi executada usando métodos análogos àqueles descritos a seguir. Os valores de metabólito mostrados na tabela 4 foram corrigidos para OD_{600}. Dois experimentos idênticos e independentes (exp. 1 e 2, *vide* **tabela 4**) foram executados para confirmar os efeitos da enzima IspA marcada proteoliticamente sobre as distribuições de metabólitos.

RESULTADOS

[00287] Em comparação com a cepa de controle DW141, a cepa DW142 contendo a enzima IspA marcada proteoliticamente apresentou níveis de DMAPP, IPP, e GPP significativamente menores em ambos os experimentos. DW142 também apresentou níveis intracelulares significativamente diminuídos de FPP em comparação ao controle. Estes resultados indicam que a etiqueta de tmRNA aumenta a degradação ou circulação de IspA no interior da célula, e reduz assim a atividade de IspA dentro destas cepas. Sem se ater à teoria, acredita-se que a redução na atividade da FPP sintase pode gerar um ambiente intracelular mais adequado para a produção de isopreno, onde mais substrato está disponível para a isopreno sintase, e menos carbono é

perdido para isoprenoides de peso molecular mais alto.

TABELA 2: Iniciadores

Iniciador	Descrição
GBIspACtmR-NA-ASV-For	ATACCTCGGCACTGGAAGCGCTAGCGGACTAC ATCATCCAGCGTAATAAAGCAGCTAACGATGAA AACTACGCAGCATCTGTTTAAAATTAACCCT-CACTAAAGGGCG (SEQ ID NO:16)
	TATTTGGCAATATCAAAACTCATCAGGGGCCTA TTAATACTTATTGTTTATAATACGACTCACTA-TAGGGCTC (SEQ ID NO:17)
ispTest1	CAAGCCGAACAGCGCGTACAAATTC (SEQ ID NO:18)
GBprimer2	CGAGACTAGTGAGACGTGCTAC (SEQ ID NO:19)

TABELA 3: Cepas

Cepa	Resistência	Descrição
MD08-97	Clor.	BL21 DE3 com etiqueta de IspA-tmRNA
DW141	Can	BL21 DE3 com Ptrc-rota inferior de MVA em MCM107 (controle)
DW142	Clor/Can	BL21 DE3 com etiqueta de IspA-tmRNA e Ptrc-rota inferior de MVA em MCM107

TABELA 4: Concentrações intracelulares de metabólito os valores de metabólito mostrados foram corrigos para od_{600}.

AMOSTRA	FPP	GPP	IPP	DMAPP
DW141 (exp. 1)	1,633	0,066	0,003	0,015
DW142 (exp. 1)	0,212	0,206	0,394	0,530
DW141 (exp. 2)	3,575	0,325	0,060	0,126
DW142 (exp. 2)	1,791	0,940	0,265	0,611

Exemplo 3: Sistema autorregulador para controlar a expressão de IspA

[00288] Promotores que foram reprimidos temporalmente durante a

fermentação apenas em uma cepa superexpressando enzimas da rota MVA e não em cepas de controle superexpressando enzimas da rota DXP ou cepas selvagens foram identificados com base em dados de expressão gênica. Sem se ater à teoria, acredita-se na hipótese de que estes promotores podem ser reprimidos devido ao maior acúmulo de compostos isoprenoides. Quando estes promotores são introduzidos para controlar a expressão de ispA, ispA pode ser reprimido em períodos de tempo que correspondem ao fluxo através da rota do isoprenoide. Entretanto, em períodos de tempo onde o fluxo é baixo, o promotor permanece induzido e assim permite a expressão de ispA. Este perfil de atividade de assinatura irá constituir um sistema de controle de expressão de ispA autorregulador.

MÉTODO PARA PURIFICAÇÃO DE RNA E ANÁLISE DE TRANSCRIÇÃO:

[00289] As cepas usadas neste estudo de transcrição do genoma são CMP457 e MCM1020. A cepa MCM1020 foi construída por eletroporação dos plasmídeos pTrcHis2B (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e pCL1920 (consulte a publicação US n° 2009/0203102, cujos conteúdos estão aqui incorporados, por referência) na cepa CMP258 (consulte o pedido de patente internacional n° PCT/US2011/ 058188, cujos conteúdos estão aqui incorporados, por referência) e seleção de uma colônia em LB + 50 mg/L de espectinomicina + 50 mg/L de carbenicilina.

[00290] As amostras de fermentação foram rapidamente diluídas a 1:5 em RNALater (Qiagen, Valencia, CA) e congeladas a -20 ℃. As células foram coletadas e lisadas em Trizol (Invitrogen) e incubadas à temperatura ambiente durante 5 minutos. Os ácidos nucleicos foram isolados por extração com adição de clorofórmio a 20% resfriado com gelo. A solução foi misturada e incubada durante 5 minutos à temperatura ambiente seguido por centrifugação a 13.000 rpm, a 4 ℃ durante

15 minutos. A fase aquosa superior foi isolada e um volume igual de etanol gelado foi adicionado. RNA foi isolado com o uso do kit RNEasy mini (Qiagen). Seguindo as instruções do fabricante, o DNA foi degradado durante o procedimento por adição de uma solução de DNase (10 µL de solução estoque de DNase I em 70 µL de tampão RDD) (Qiagen) e incubação à temperatura ambiente durante 30 minutos. RNA foi eluído a partir da coluna RNeasy em água sem nuclease. Um mínimo de 20 µg de RNA foi coletado de cada amostra como medido com o uso do instrumento Nanodrop. RNA foi adicionalmente purificado por precipitação pela adição de 1/10 de volume de acetato de sódio 3 M. O glicogênio (grau de RNA junto à Fermentas) foi adicionado para uma concentração final de 1 µg/µL seguido de adição de 2,5 volumes de etanol resfriado com gelo. A solução foi incubada durante 60 minutos a -80°X e, em seguida, centrifugada durante 15 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pélete de RNA foi lavado brevemente com etanol a 70% resfriado com gelo. O pélete de RNA foi seco ao ar durante 20 minutos e dissolvido em água sem nuclease a uma concentração de 1 µg/µL. A qualidade e a concentração foram medidas com o uso de um instrumento Nanodrop e por eletroforese em gel. A síntese de cDNA, análise da transcrição e marcação foram realizadas pela Roche NimbleGen (Islândia) com o uso uma micromatriz 385K 4-plex projetada especificamente para *E. coli* BL21. Os dados resultantes foram analisados com o uso de GenespringGX versão 11 (Agilent). Determinados promotores e seus níveis de expressão arbitrários elucidados a partir da fermentação em estágio tardio da cepa CMP457 com a rota MVA completa são mostrados na **tabela 5**.

TABELA 5: Promotores reprimidos tardiamente durante a fermentação de batelada alimentada da cepa cmp457 produtora de isopreno com a rota mva. O nome do gene, a id entrez e os níveis de expressão são mostrados para inúmeros pontos no tempo durante a fermentação.

		Ponto de tempo da fermentação									
Gene	**ID Entrez**	**4 h**	**6 h**	**8 h**	**12 h**	**16 h**	**18 h**	**20 h**	**22 h**	**26 h**	**32 h**
efeO	945603	2265,6	1921,8	1913,7	2146,7	587,8	423,2	253,9	601,5	228,9	282,6
kpsC	8115953	935,9	1261,5	1406,6	1399,9	436,0	196,8	91,3	107,3	71,9	77,0
kpsD	8115949	1042,0	1694,9	2659,1	2563,7	882,5	371,4	120,8	112,6	242,2	344,4
kpsE	8115950	964,5	1871,4	2764,1	2795,4	1136,1	446,0	132,2	109,0	139,0	98,1
kpsF	8116223	3805,1	5650,1	7092,4	6239,4	2154,3	888,0	145,3	97,4	171,6	76,6
kpsS	8115947	1611,2	1796,7	1955,0	1722,3	721,8	324,4	108,2	111,9	93,3	128,4
kpsU	8115948	857,7	1535,7	2244,5	1852,3	687,3	268,0	127,0	126,1	137,7	168,1
nmpC	946786	2734,3	2833,2	5446,5	2678,4	992,6	339,4	162,4	74,0	55,0	160,2
sodA	948403	7680,9	5697,5	5490,4	5380,3	1981,1	408,5	598,5	619,3	649,6	914,0
ybl129	8112884	30513,2	35702,2	39585,4	37840,7	22014,0	10849,2	4727,3	4456,2	5097,4	3665,1
ybl130	8116226	15322,6	21237,2	23730,5	17822,7	10629,7	4955,7	1510,8	1098,1	941,2	438,5
ybl131	8116228	16061,5	22400,0	25088,1	19536,8	9890,0	3587,4	1031,4	734,6	349,4	229,5
yddV	945835	1712,2	1102,2	598,5	604,1	282,7	214,3	204,5	116,5	57,7	92,9
ydiU	946219	497,9	514,3	508,6	522,6	223,0	109,4	70,7	74,4	59,0	48,0

[00291] Um exemplo de um promotor útil para o controle da expressão de ispA é o que controla a expressão de yddV. Este promotor é especificamente reprimido tardiamente durante a fermentação na cepa com a rota MVA. Em contrapartida, este promotor não foi reprimido na cepa de *E. coli* selvagem, conforme mostrado na **figura 5**. A proteína YddV se liga ao heme, um composto que provavelmente irá mudar sua concentração durante condições de alto fluxo de isoprenoide. As taxas de respiração das fermentações analisadas são mostradas na **figura 6**.

Exemplo 4: Inserção de IspA no lócus de yhfS

[00292] Protocolos de reação em cadeia de polimerase (PCR) em colônia foram feitos de acordo com o seguinte método. Uma colônia bacteriana foi agitada em 30 µl de H_2O e aquecida até 95 ℃ durante 5 minutos. A solução resultante foi centrifugada e 2 µl do sobrenadante foram usados como modelo na seguinte reação de PCR: 2 µl de colônia em H_2O, 10 µl de tampão Herculase®, 1 µl de dNTPs 100 mM, 1,25 µl de iniciador de sentido direto a 10 µM, 1,25 µl de iniciador de sentido reverso 10 µM, 1 µl de DNA polimerase Herculase® intensificada (Agilent Technologies, Stratagene Products Division, La Jolla, Califórnia, EUA), e 33,5 µl de água desionizada. A reação de PCR foi executada em um termociclador PCR Express (Thermo Hybaid, Franklin, MA) da seguinte forma: 95℃/2 minutos; 30 ciclos de 95℃/30 segundos, x℃/30 segundos, 72℃/60 segundos; e 72℃/(40 segundos/kb de produto). A reação foi, então, resfriada até 4℃. A temperatura de anelamento de x℃ foi escolhida para ser 3℃ menor que a menor temperatura de fusão do par de iniciadores. O tamanho do fragmento de PCR resultante foi determinado em um E-gel® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) pré-moldado a 0,8%, com o uso do marcador de peso molecular DNA Molecular Weight Marker X (75 a 12.216 bp) (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha) como marcador de tamanho.

[00293] Para a inserção de IspA no lócus de yhfS, três pedaços de

DNA foram gerados por PCR. O pedaço 1 contém uma sequência de 15 bp que permite união pelo kit sem emendas (Invitrogen) a um vetor pBBR1MCS5 digerido por XbaI/EcoRI (Kovach et al. 1995, *Gene* 166:175-176), uma região homóloga à região de yhfS de BL21, um marcador de canamicina, e 15 bp que permitem união ao promotor do operon xseB-ispA-dxs. Os iniciadores usados para se obter este pedaço são CMP247 (5'-gcggtggcggccgctttgtcatcggttaacgctggaacacctgccgcgcgcaacgttgccagcacc ctccttagttcctattccgaagttc-3' (SEQ ID NO:20)) e CMP248 (5'-gctggagctgcttcgaagttcc-3' (SEQ ID NO:21)), e o molde foi pKD4 (Datsenko e Wanner, *PNAS*, 2000, 97(12), 6640-6645). O pedaço 2 contém o promotor o operon xseB-ispA-dxs. Os iniciadores usados para se obter este fragmento são CMP249 (5'-cgaagcagctccagcgaacaatttaatgataaacttcatggcg-3' (SEQ ID NO:22)) e CMP250 (5'- AATGAATGTCTGACTCTCAATATTTTTCGC-3' (SEQ ID NO:23), e o molde foi DNA cromossômico de BL21 ou um derivado do mesmo. Iniciadores foram projetados para permitir união sem emendas ao pedaço 1 e ao pedaço 3. O pedaço 3 contém o gene *ispA* de *E. coli*, e dois conjuntos de 15 bp que permitem união com o pedaço 2 e pBBR1MCS5 digerido por XbaI e EcoRI. Os iniciadores usados para se obter este fragmento são CMP255 (5'-agtcagacattcattatggactttccgcagcaactcg -3' (SEQ ID NO:24)) e CMP256 (5'-ATAAGCTTGATATCGacctgtcggcactgaagcaggtcgtcgacgagcaacaaccgga tgcggcgTTATTTATTACGCTGGATGATGTAGTCC-3' (SEQ ID NO:25)), e o molde foi DNA cromossômico de BL21 ou um derivado do mesmo.

[00294] As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram todas feitas usando Herculase II Fusion de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante (Agilent, Santa Clara, CA, EUA). Elas foram purificadas usando o kit de purificação de PCR da Qiagen (Germantown, MD,

EUA). Os pedaços 1, 2 e 3 foram então unidos com o plasmídeo pBBR1-MCS5 digerido por EcoRI/XbaI usando o kit de clonagem e união sem emendas GeneArt (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. A reação foi transformada em células *E. coli* Top10 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), e os transformantes foram selecionados em LB + 20 mg/L de canamicina. O plasmídeo foi isolado de uma destas colônias, e designado pCMP944. A presença do construto da direita no plasmídeo foi confirmada por sequenciamento (Quintara Bio, Albany, CA, EUA). O plasmídio pCMP944 foi usado como um molde para a reação de PCR usando os iniciadores CMP257 (5'-cattcgcgccgcattcacagccgattcgagccaccttcatcaccgcatagttgtcatcggttaa-gctggaacac-3' (SEQ ID NO:26)) e CMP258 (5'-GGTTATTATTGAGCAGATGGGGCTG-CGCTTATTACTGTTGATTTCAATGACCTGTCGG CACTGAAGCAGG-3' (SEQ ID NO:27)). O produto de PCR foi purificado usando o kit de purificação de PCR Qiagen (Germantown, MD, EUA) e digerido com a enzima de restrição DpnI. Após purificação adicional, este produto de PCR foi usado em uma reação de recombinação (Datsenko e Wanner, *supra*) com a cepa CMP451 (consulte pedido de patente US n° 13/283.564). Os transformantes foram selecionados em LB + 10 mg/L de canamicina. Uma colônia, que foi observada tendo o tamanho correto por PCR (usando os iniciadores CMP267 (5'-cgattcgagccaccttcatcacc-3' (SEQ ID NO:28)) e CMP268 (5'-CAG CGT CTT CTG GTG CAT GAC G -3' (SEQ ID NO:29))) foi chamada de CMP981. O marcador de canamicina foi espiralizado com pCP20 (Datsenko e Wanner, *supra*) para fazer CMP992 que foi, então, usado para modificações adicionais. Para se obter a estrutura espiralizada, uma colônia transformada com pCP20 (cultivada a 30℃ com 50 mg/L de carbenicilina) foi aplicada por estriamento em LB e cultivada a 42℃ de um dia para o out ro. No dia seguinte, as colônias foram selecionadas e colocadas em LB e LB + 10 mg/L

de canamicina. Uma colônia com o marcador espiralizado cresceu em LB mas não em LB + 10 mg/L de canamicina.

Exemplo 5: Supressão de IspA endógeno

[00295] Para esta reação, três pedaços de DNA foram gerados por PCR. Protocolos de reação em cadeia de polimerase foram feitos de acordo com o método descrito no Exemplo 4. O pedaço 1 contém 289 bp do gene thiI de BL21 e seu promotor, flanqueado por 15 bp que permitem união sem emendas (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) a um vetor pBBR1-MCS5 digerido com XbaI/EcoRI (Kovach et al., *supra*) e o pedaço 2 descrito a seguir. Os iniciadores usados para se obter este pedaço foram CMP236 (5'- Gcggtggcggccgctgaaccaacgctttctcgaaaatatcg-3' (SEQ ID NO:30)) e CMP237 (5'- cagcctacacaatcgagcgatgttagtggtatacttccgc-3' (SEQ ID NO:31)), e o molde foi DNA cromossômico de *E. coli* BL21 ou um derivado do mesmo. O pedaço 2 contém um cassete de cloranfenicol flanqueado por sítios de FRT. Os iniciadores usados para se obter este pedaço foram CMP234 (5'-Cgattgtgtaggctggagctgcttc-3' (SEQ ID NO:32)) e CMP235 (5'-gtccatatgaatatcctccttagttc-3' (SEQ ID NO:33)), e o molde foi pKD3 (Datsenko e Wanner, *supra*). O pedaço 3 contém um fragmento de DNA contendo o promotor do operon xseB-ispA-dxs e DNA a jusante até aproximadamente o meio do gene ispA. Os iniciadores usados para se obter este pedaço foram CMP238 (5'-gatattcatatggacttgctgcgcacatcaccttacc-3' (SEQ ID NO:34)) e CMP239 (5'-ATAAGCTTGATATCG ccttccgcgtctaaatctagtgcc-3' (SEQ ID NO:35)) e o molde foi DNA cromossômico de *E. coli* BL21 ou derivado.

[00296] Os pedaços 1, 2 e 3 foram então unidos com o plasmídeo pBBR1-MCS5 digerido por EcoRI/XbaI usando o kit de clonagem e união sem emendas GeneArt (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. A reação foi transformada em células *E. coli* Top10 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), e

os transformantes foram selecionados em LB + 25 mg/L de cloranfenicol. O plasmídeo foi isolado de uma destas colônias, e designado pCMP935. A presença do construto da direita no plasmídeo foi confirmada por sequenciamento (Quintara Bio, Albany, CA, EUA).

[00297] O plasmídio pCMP935 foi usado como um molde para uma reação de PCR usando os iniciadores CMP241 (5'- gaaccaacgctttctcgaaaatatcg-3' (SEQ ID NO:36) e CMP242 (5'-ccttccgcgtctaaatctagtgcc-3' (SEQ ID NO:37). O produto de PCR foi purificado usando o kit de purificação de PCR Qiagen (Germantown, MD, EUA) e digerido com a enzima de restrição DpnI. Após purificação adicional, este produto de PCR foi usado em uma reação de recombinação (Datsenko e Wanner, *supra*) com a cepa CMP451 (anteriormente apresentada no pedido de patente US n° 13/283.564). Os transformantes foram selecionados em LB + 5 mg/L de cloranfenicol. Uma colônia, que foi observada tendo o tamanho correto por PCR (usando os iniciadores CMP265 (5'-cacgcgtacgcagaaggttttgc-3' (SEQ ID NO:38)) e CMP266 (5'-CAGTGCCAGGGTCGGGTATTTGG-3' (SEQ ID NO:39))) foi chamada de CMP939. A CMP939 tinha crescimento similar ao seu progenitor, CMP451.

[00298] O plasmídio pCMP935 foi submetido a uma reação Quikchange usando o kit Quikchange $ de acordo com o fabricante (Agilent, Santa Clara, CA, EUA). Os iniciadores usado foram CMP245 (5'- ctttacaccggacaatgagtaatcgccccactgccctttcag-3' (SEQ ID NO:40)) e CMP246 (5'- ctgaaagggcagtggggcgattactcattgtccggtgtaaaag-3' (SEQ ID NO:41)). O plasmídio assim obtido foi chamado pCMP948 e não codifica ispA já que o ATG e os 20 primeiros aminoácidos do gene foram removidos. O plasmídio pCMP948 foi usado como um molde para uma reação de PCR usando os iniciadores CMP241 (5'- gaaccaacgctttctcgaaaatatcg-3' (SEQ ID NO:42)) e CMP242 (5'-ccttccgcgtctaaatctagtgcc-3' (SEQ ID NO:43)). O produto de PCR foi

purificado usando o kit de purificação de PCR Qiagen (Germantown, MD, EUA) e digerido com a enzima de restrição DpnI. Após purificação adicional, este produto de PCR foi usado em uma reação de recombinação (Datsenko and Wanner, *supra*) com a cepa CMP992. Os transformantes foram selecionados em LB + 5 mg/L de cloranfenicol. Uma colônia, que foi observada tendo o tamanho correto por PCR (usando os iniciadores CMP265 (5'- cacgcgtacgcagaaggttttgc-3' (SEQ ID NO:44)) e CMP266 (5'-CAGTGCCAGGGTCGGGTATTTGG-3' (SEQ ID NO:45))) foi chamada de CMP1018. O marcador de canamicina foi espiralizado com pCP20 (Datsenko e Wanner, *supra*) para fazer CMP1030 que foi, então, usado para modificações adicionais. Para se obter a estrutura espiralizada, uma colônia transformada com pCP20 (cultivada a 30 ℃ com 50 mg/L de carbenicilina) foi aplicada por estriamento em LB e cultivada a 42 ℃ de um dia para o outro. No dia seguinte, as colônias foram selecionadas e colocadas em LB e LB + 5 mg/L de cloranfenicol. Uma colônia com o marcador espiralizado cresce em LB mas não em LB + 5 mg/L de cloranfenicol. Os plasmídeos MCM82 (consulte, Pub. U.S. n° 2011/0159557) e pCHL243 (descrito anteriormente no pedido de patente US n° 13/2 83.564) foram eletroporados concomitantemente em CMP1030. Uma colônia que cresce em LB + 50 mg/L de carbenicilina e 50 mg/L de espectinomicina foi selecionada e denominada CMP1061.

Exemplo 6: Introdução de PyddV-lspA no lócus de yhfS

[00299] Para esta reação, três pedaços de DNA foram gerados por PCR. Protocolos de reação em cadeia de polimerase foram feitos de acordo com o método descrito no Exemplo 4. O pedaço 1 contém uma sequência de 15 bp que permite união pelo kit sem emendas (Invitrogen) a um vetor pBBR1MCS5 digerido por XbaI/EcoRI (Kovach et al., *supra*), uma região homóloga à região de yhfS de BL21, um marcador de canamicina, e 15 bp que permitem união ao promotor do operon

xseB-ispA-dxs. Os iniciadores usados para se obter este pedaço são CMP247 (5'-gcggtggcggccgctttgtcatcggttaacgctggaacacctgccgcgcgcaacgttgccagcaccctccttagttcctattccgaagttc-3' (SEQ ID NO:46)) e CMP248 (5'-gctggagctgcttcgaagttcc-3' (SEQ ID NO:47)), e o molde é pKD4 (Datsenko e Wanner, *supra*). O pedaço 2 contém o promotor do gene yddV. Os iniciadores usados para se obter este fragmento são CMP338 (5'-cgaagcagctccagcgaactatcccactactaatcatgcttac-3' (SEQ ID NO:48)) e CMP339 (5'- ctgcggaaagtccatAATTCACACCCTTATAAGGCTGGG-3' (SEQ ID NO:49)), e o molde é DNA cromossômico de BL21 ou um derivado do mesmo. Iniciadores foram projetados para permitir união sem emendas ao pedaço 1 e ao pedaço 3. O pedaço 3 contém o gene ispA de *E. coli* cujos códons foram alterados por GeneOracle (**Figura 8**), e dois conjuntos de 15 bp que permitem união com o pedaço 2 e pBBR1-MCS5 digerido por XbaI e EcoRI. Os iniciadores usados para se obter este fragmento são CMP340 (5'-ataagggtgtgaatt ATG-GACTTTCCGCAGCAACTCG-3' (SEQ ID NO:50)) e CMP256 (5'-ATAAGCTTGATATCGacctgtcggcactgaagcaggtcgtcgacgagcaacaaccggatgcggcgTTATTTATTACGCTGGATGATGTAGTCC-3' (SEQ ID NO:51)), e o molde é o plasmídeo pMCM1535 (**FIGs. 9 a 10**).

[00300] As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram todas feitas usando Herculase II Fusion de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante (Agilent, Santa Clara, CA, EUA). Elas foram purificadas usando o kit de purificação de PCR da Qiagen (Germantown, MD, EUA). Os pedaços 1, 2 e 3 foram então unidos com o plasmídeo pBBR1-MCS5 digerido por EcoRI/XbaI usando o kit de clonagem e união sem emendas GeneArt (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. A reação foi transformada em células *E. coli* Top10 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), e os transformantes foram selecionados em LB + 20 mg/L de canami-

cina. O plasmídeo foi isolado de uma destas colônias, e designado pCMP1046. A presença do construto da direita no plasmídeo foi confirmada por sequenciamento (Quintara Bio, Albany, CA, EUA). O plasmídio pCMP1046 foi usado como um molde para a reação de PCR usando os iniciadores CMP257 (5'-cattcgcgccgcattcacagccgattcgagccaccttcatcaccgcatagttgtcatcggttaacgctggaacac-3' (SEQ ID NO:52)) e CMP258 (5'-GGTTATTATTGAGCAGATGGGGCTG-CGCTTATTACTGTTGATTTCAATGACCTGTCGG CACTGAAGCAGG-3' (SEQ ID NO:53)). O produto de PCR foi purificado usando o kit de purificação de PCR Qiagen (Germantown, MD, EUA) e digerido com a enzima de restrição DpnI. Após purificação adicional, este produto de PCR foi usado em uma reação de recombinação (Datsenko e Wanner, *supra*) com a cepa CMP1018. Os transformantes foram selecionados em LB + 10 mg/L de canamicina. Uma colônia, que foi observada tendo o tamanho correto por PCR (usando os iniciadores CMP267 (5'-cgattcgagccaccttcatcacc-3' (SEQ ID NO:54)) e CMP268 (5'-CAGCGTCTTCTGGTGCATGACG-3' (SEQ ID NO:55))) foi chamada de CMP1067. Os marcadores de canamicina e cloranfenicol foram espiralizados com pCP20 (Datsenko e Wanner, *supra*) para fazer CMP1075. Para se obter a estrutura espiralizada, uma colônia transformada com pCP20 (cultivada a 30 ℃ com 50 mg/L de carbenicilina) foi aplicada por estriamento em LB e cultivada a 42 ℃ de um dia para o outro. No dia seguinte, as colônias foram selecionadas e colocadas em LB e LB + 10 mg/L de canamicina e LB + 5 mg/L de cloranfenicol. Uma colônia com o marcador espiralizado cresce em LB mas não em LB + 10 mg/L de canamicina ou LB + 5 mg/L de cloranfenicol. Os plasmídeos MCM82 (descrito anteriormente) e pCHL243 foram eletroporados em CMP1075 concomitantemente. Uma colônia que cresce em LB + 50 mg/L de carbenicilina e 50 mg/L de espectinomicina foi se-

lecionada e denominada CMP1082.

Exemplo 7: Construção da cepa CMP1059 (ispA ligado a uma etiqueta proteolítica)

[00301] Um produto de PCR contendo um cassete de canamicina flanqueado por sítios de FRT e regiões homólogas a montante e a jusante de IdhA foi obtido com o uso dos métodos descritos acima, uma cepa Keio JW1375 (Baba *et al.*, 2006, *Mol Syst Biol.*, 2:1-11) que contém uma deleção de IdhA, e os iniciadores IdhAseqF2 (5'- CTA ATG CAA TAC GTG TCC CGA GC-3' (SEQ ID NO:56)) e IdhAseqR (5'-ggcttaccgtttacgctttccagc -3' (SEQ ID NO:57)). Este produto de PCR foi usado em uma reação de recombinação (consulte o protocolo descrito acima) com *E. coli* BL21 para formar BL21 IdhA::Kan. Um lisado P1 foi preparado a partir da última cepa e foi usado para transduzir CMP451. Os lisados P1 foram preparados e usados de acordo com o método descrito em Ausubel, et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley e Sons, Inc. Uma colônia foi selecionada em LB + 10 mg/L de canamicina e denominada CMP596. O marcador de canamicina foi removido com o uso do protocolo recomendado pelo fabricante (Gene Bridges, Heidelberg, Alemanha) para formar a cepa CMP722.

Exemplo 8: Produção de isopreno em cepas contendo uma modificação de ispA

MÉTODOS

[00302] **Receita do meio TM3** (por litro do meio de fermentação): 13,6 g de K2HPO4, 13,6 g de KH2PO4, 2 g de MgSO4*7H2O, 2 g de monoidrato de ácido cítrico, 0,3 g de citrato férrico de amônio, 3,2 g de (NH4)2SO4, 0,2 g de extrato de levedura, 1 ml de solução de metais-traço a 1.000X. Todos os componentes são adicionados juntos e dissolvidos em H2O desionizada. O pH é ajustado para 6,8 com hidróxido de amônio (30%) e levado para o volume. O meio é esterilizado por filtração, com um filtro de 0,22 mícron. 10,0 g de glicose e antibióticos

são adicionados após a esterilização e ajuste de pH.

[00303] **Solução de metais-traço a 1.000X** (por litro do meio de fermentação): 40 g de Ácido cítrico*H2O, 30 g de MnSO4*H2O, 10 g de NaCl, 1 g de FeSO4*7H2O, 1 g de CoCl2*6H2O, 1 g de ZnSO4*7H2O, 100 mg de CuSO4*5H2O, 100 mg de H3BO3, 100 mg de NaMoO4*2H2O. Cada componente foi dissolvido um de cada vez em H2O desionizada. O pH é ajustado para 3,0 com HCl/NaOH, e, então, a solução é levada ao volume e esterilizada por filtração com um filtro de 0,22 mícron.

[00304] As células são cultivadas de um dia para o outro em caldo de Luria-Bertani + antibióticos. No dia seguinte, elas são diluídas até uma OD600 de 0,1 em 20 mL de meio TM3 contendo 50 µg/ml de espectinomicina e 50 µg/mL de carbenicilina (em um frasco Erlenmeyer de 250 mL com chicanas), e incubadas a 34℃ e 200 r pm. Após 2 h de crescimento, a OD600 é medida e 200 µm de IPTG são adicionados. As amostras são tomadas regularmente durante o curso da fermentação. Em cada ponto de tempo, a OD600 é medida. Além disso, a análise do efluente gasoso de isopreno é realizada com o uso de ensaio de espaço livre em espectrômetro de massa-cromatógrafo gasoso (GC-MS) (Agilent) (consulte a publicação US n° US 2 005/0287655, cujos conteúdos estão aqui incorporados a título de referência em sua totalidade). Cem microlitros de caldo total são colocados em placas em um frasco GC lacrado e incubados a 34℃ e 200 rpm d urante um tempo fixo de 30 minutos. Em seguida a uma etapa de extermínio por calor, consistindo em uma incubação a 70℃ durante 7 minutos, a amostra é carregada no GC. A produtividade específica relatada é a quantidade de isopreno em µg/L lida por GC dividida pelo tempo de incubação (30 min) e a OD600 medida.

RESULTADOS

[00305] Cepas com ispA selvagem, DW415 (descrito anteriormente

no pedido de patente US n° 13/283.564) ou ispA re-e strututrado (CMP1061) cresceram ligeiramente mais lentamente do que as cepas com uma expressão de ispA modificada (CMP1059 e CMP1082) (**FIG. 7a**). A produtividade específica de todas as cepas foi muito similar (**FIG. 7b**).

Exemplo 9: Fermentação de grande escala de CMP1082

[00306] Os testes de fermentação foram feitos para testar determinadas métricas de desempenho (rendimento cumulativo de isopreno em relação à glicose, produtividade de isopreno, produtividade específica de pico e índice de produtividade celular) da cepa CMP1082 (HMB GI1.2gltA, PyddVIspA_GO, truncIspA, MCM82, pCHL243) àquela de uma cepa de controle CMP1043 (HMB GI1.2gltA, -MCM82, pCHL243) de acordo com o seguinte protocolo.

[00307] **Receita do meio** (por litro do meio de fermentação): K2HPO4 7,5 g, MgSO4 * 7H2O 2 g, monoidrato de ácido cítrico 2 g, citrato férrico de amônio 0,3 g, extrato de levedura 0,5 g, 1,6 mL de ácido sulfúrico a 50%, 1 ml de solução de traços de metal modificada a 1.000X. Todos os componentes foram adicionados juntos e dissolvidos em Di H_2O. Esta solução foi aquecida esterilizada (123℃ du rante 20 minutos). O pH foi ajustado para 7,0 com hidróxido de amônio (28%) e levado ao volume. 10 g de Glicose, 8 mL de Solução de Vitamina, e antibióticos foram adicionados após a esterilização e o ajuste de pH.

[00308] **Solução de metais-traço modificada a 1.000X** (por litro): Ácidos cítricos * H2O 40 g, MnSO4 * H2O 30 g, NaCl 10 g, FeSO4 * 7H2O 1 g, CoCl2 * 6H2O 1 g, ZnSO * 7H2O 1 g, CuSO4 * 5H2O 100 mg, H3BO3 100 mg, NaMoO4 * 2H2O 100 mg. Cada componente foi dissolvido um por vez em água desionizada, o pH foi ajustado em 3,0 com HCl/NaOH, e, então, a solução foi levada ao volume e esterilizada por filtro com um filtro de 0,22 mícron.

[00309] **Solução de vitamina** (por litro): 1,0 g de cloridrato de tia-

mina, 1,0 g de D-(+)-biotina, 1,0 g de ácido nicotínico, 4,0 g de cloridrato de piridoxina. Cada componente foi dissolvido um por vez em água desionizada, o pH foi ajustado em 3,0 com HCl/NaOH, e, então, a solução foi levada ao volume e esterilizada por filtro com filtro de 0,22 mícron.

[00310] **Solução salina macro** (por litro): 296 g de MgSO4 * 7H2O, 296 g de monoidrato de ácido cítrico, 49,6 g de citrato férrico de amônio. Todos os componentes foram dissolvidos em água, q.s. para o volume e esterilizados por filtração com filtro de 0,22 mícron.

[00311] **Solução de alimentação** (por quilograma): 0,590 kg de glicose, 0,393 kg de H2O desionizada, 7,4 g de K2HPO4, e 8,9 g de Foamblast882 100%. Todos os componentes foram misturados juntos e autoclavados. Após autoclavagem da solução de alimentação, os suplementos de nutrientes são adicionados ao tubo de alimentação em uma capela estéril. As adições pós-esterilização à alimentação são (por quilograma de solução de alimentação), 5,54 ml de solução salina macro, 6,55 ml de solução de vitamina, 0,82 ml de solução de metais-traço modificada a 1.000X.

[00312] **Análise de metabólitos**: A extração de metabólitos de *E. coli.* foi obtida mediante retirada de aproximadamente 3 mL de cultura para um tubo cheio com 9 mL de metanol gelado seco. As amostras resultantes foram pesadas para calcular a quantidade de caldo de amostragem e, em seguida, armazenadas a -80 ℃ até análise posterior. Para a extração e concentração de metabólito, alíquotas de 0,5 mL de suspensão de células (uma alíquota de 1 mL foi usada caso a densidade celular da cultura medida como OD_{600} estivesse abaixo de 50) foram diluídas com 2,5 mL de mistura de metanol/tampão de acetato de amônio (5 mM, pH=8,0) (6:1, v/v) e os restos de células foram peletizados por centrifugação por 5 minutos. O sobrenadante foi coletado e carregado em colunas Strata-X-AW da Phenomenex (33 µm de 30 mg/3 mL de Troca Aniônica Fraca

Polimérica). O pélete de células foi extraído mais duas vezes, primeiro com 3 mL da mistura de metanol/tampão de acetato de amônio (5 mM, pH=8,0) (6:1 v/v), e, em seguida, com 3 mL de mistura de metanol/tampão de acetato de amônio (5 mM, pH=8,0) (1:1 v/v). Nas duas vezes as células foram peletizadas por centrifugação, e os sobrenadantes resultantes foram consecutivamente carregados nas mesmas colunas Strata-X-AW. Durante a extração-centrifugação, as amostras com as células foram mantidas abaixo de 4℃. Após a lavage m das colunas com 1 mL de água e 1 mL de metanol, os metabólitos de interesse foram eluídos das colunas primeiramente com 0,3 mL de mistura de NH_4OH/metanol concentrada (1:14, v/v) e, então, com 0,3 mL de mistura de NH_4OH/metanol/água concentrada (1:12:2, v/v/v). O eluente resultante foi neutralizado pela adição de 20 µL de ácido acético glacial e, em seguida, clarificado por centrifugação.

[00313] A análise de metabólitos foi realizada por espectrometria de massa com o uso de um sistema TSQ Quantum Access TSQ (Thermo Scientific). Todo o controle do sistema, aquisição de dados e avaliação de dados espectrais de massa foram realizados com o uso do software XCalibur e LCQuan (Thermo Scientific). Para o método LC-ESI-MS/MS, uma coluna de HPLC quiral de 5 µM Nucleodex β-OH (100×2 mm, Macherey-Nagel, Alemanha) foi usada com um cartucho de guarda de CC 8/4 Nucleodex beta-OH. Um gradiente de fase móvel foi aplicado, no qual a fase móvel A era tampão de acetato de amônio 100 mM (grau SigmaUltra, Sigma) (pH=8) em água de grau MilliQ, a fase móvel B era água de grau MilliQ, e a fase móvel C era acetonitrila de grau de LC-MS (Chromasolv, Riedel-de Haën). As temperaturas da coluna e da bandeja da amostra foram reduzidas para 5 ℃ e 4 ℃, respectivamente. O volume de injeção foi 10 µL.

[00314] A detecção de massa foi realizada com o uso de ionização por eletrospray no modo negativo (tensão de aspersão de ESI de 3,0

kV e a temperatura do tubo de transferência de íons de 390℃). Os seguintes valores de m/z para íons precursores foram selecionados para detectar os metabólitos de interesse no modo SRM: 245,0 para IPP e DMAPP, 313,1 para GPP, 381,1 para FPP, 227,0 para MVP, e 307,1 para MVPP. As concentrações dos metabólitos foram determinadas com base nas intensidades integradas dos picos gerados pelo íon de PO3 − produto (m/z =79,0). As curvas de calibração obtidas por injeção de padrões foram usadas para calcular as concentrações de metabólitos nos extratos celulares. Os padrões de IPP, DMAPP, GPP, e FPP foram adquiridos junto à Echelon Biosciences Inc e MVP e MVPP (formas-R) foram adquiridos junto à Sigma-Aldrich. As concentrações intracelulares dos metabólitos foram determinadas com base na presunção de que em 1 mL da cultura a OD_{600}=200 o volume integrado de todas as células é 50 µL.

[00315] Este experimento foi realizado em pH 7,0 e temperatura de 34 ℃. Um frasco congelado da cepa de *E. coli* foi descongelado e inoculado em um frasco com meio de triptona-extrato de levedura e os antibióticos adequados. Depois que inóculo cresceu para a densidade óptica 1,0, medida a 550 nm (OD_{550}), 500 ml foram usados para inocular um biorreator de 15 L e levar o volume do inicial do tanque para 5 L. O meio em batelada tinha glicose em batelada a 9,7 g/L. A indução foi obtida pela adição de isopropil-beta-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) em uma concentração final de 200 µM quando as células estavam em uma OD_{550} de 6. Uma vez que a glicose foi consumida pela cultura, como assinalado por uma elevação no pH, a solução de alimentação de glicose foi alimentada para atender as demandas metabólicas em taxas menores que ou iguais a 10 g/min. A fermentação foi executada por tempo suficiente para determinar o rendimento máximo em massa de isopreno relativo à glicose, um total de 48 a 72 h de tempo decorrido de fermentação.

[00316] O isopreno é volátil e pode ser eficientemente varrido do tanque pelo gás de entrada. O nível de isopreno no efluente gasoso do biorreator foi determinado usando um espectrômetro de massa iSCAN (Hamilton Sundstrand). O gás de entrada era uma mistura adaptada de oxigênio e nitrogênio (~9,3 %, em volume e 90,7 %, em volume, respectivamente). As concentrações de citrato, glicose, acetato, e mevalonato no caldo de fermentação foram determinadas em amostras de caldo tomadas a intervalos de 4 horas por análise de HPLC. As concentrações nas amostras de caldo foram determinadas por comparação da resposta do índice de refração em função de uma curva de calibração previamente gerada usando um padrão de uma concentração conhecida.

RESULTADOS

TABELA 6. Métricas de produtividade de isopreno

Descrição da cepa/Número de testes	EFT (h)	Titulação de isopreno (g/L)	Produtividade volumétrica de isopreno (g/L/h)	% de rendimento total de isopreno em relação à glicose (g/g)	CPI (g de isopreno/g de DCW)	Produtividade específica de pico (mg de isopreno/L/h/OD)
CMP1043 Cepa de controle	44	74,41	1,69	14,26	1,64	26,87 (a 16 h EFT)
CMP1082 Cepa PyddV-ispA	44	83,95	1,91	16,03	1,79	30,31 (em 12 h EFT)

[00317] %, em peso de rendimento em relação à glicose = total de isopreno(t)/[(alimentação Wt(0)-peso da alimentação (t)+83,5)*0,59)],

[00318] onde 0,59 é a porcentagem em peso (%p) de glicose na solução de alimentação de glicose e 83,5 é a quantidade em gramas desta batelada de alimentação no fermentador em t=0. Cada alimentação teve sua % em peso medida de forma independente.

[00319] Titulação de isopreno (g/L) = taxa de evolução de isopreno integrada (mol/L) * peso molecular de isopreno (g/mol)

[00320] CPI = total em gramas de isopreno / total em gramas de peso da célula seco.

[00321] Produtividade específica (mg/L/h/OD) = HgER*68,117 g/mol/OD (HgER = taxa de evolução de isopreno).

[00322] HgER é a taxa de evolução de isopreno em (mmol/L/h).

[00323] OD = densidade óptica = Absorbância a 550 nm * fator de diluição em água

CONCLUSÕES

[00324] A fermentação com a cepa com promotor ispA modificado (CMP1082) tinha um rendimento de isopreno maior em relação à glicose do que a cepa de controle (CMP1043) que usa um promotor de ispA selvagem, consulte a **figura 13** e a **tabela 6**. A fermentação com a cepa com promotor de ispA modificado (CMP1082) tinha uma titulação de isopreno mais elevada (consulte a **figura 14** e a **tabela 6**), um índice de produtividade celular mais elevado (consulte a **figura 15** e a **tabela 6**), uma produtividade volumétrica de isopreno maior (consulte a **figura 16** e a **tabela 6**), e uma produtividade específica de pico de isopreno mais elevada (na faixa de 12 h; consulte a **figura 17** e a **tabela 6**) do que a cepa de controle (CMP1043) que usa um promotor de ispA selvagem.

Exemplo 10: Fermentação de grande escala de CMP1059

[00325] Protocolos de reação em cadeia de polimerase foram feitos de acordo com o método descrito no Exemplo 4. Um lisado P1 foi produzido a partir da cepa MD08-97 (descrita acima) e usado para transduzir CMP722. Uma colônia foi selecionada em LB + 5 mg/L de cloranfenicol e denominada CMP1024. CMP1024 foi verificado por PCR e sequenciado para demonstrar a presença da etiqueta proteolítica. O marcador de cloranfenicol foi espiralizado usando pCP20 (Datsenko e Wanner, *supra*) e uma colônia sensível ao cloranfenicol foi selecionada e chamada CMP1034. Os plasmídeos MCM82 e pCHL243 foram ele-

troporados em CMP1034 concomitantemente. Uma colônia que cresce em LB + 50 mg/L de carbenicilina e 50 mg/L de espectinomicina foi selecionada e denominada CMP105.

[00326] Os testes de fermentação foram feitos para testar determinadas métricas de desempenho (rendimento cumulativo de isopreno em relação à glicose, produtividade de isopreno, produtividade específica de pico e índice de produtividade celular) da cepa CMP1059 (HMB GI1.2gltA, ispA_prot_tag, MCM82, pCHL243) àquela de uma cepa de controle CMP1043 (descrita anteriormente) de acordo com o seguinte protocolo.

[00327] **Receita do meio** (por litro do meio de fermentação): K2HPO4 7,5 g, MgSO4 * 7H2O 2 g, monoidrato de ácido cítrico 2 g, citrato férrico de amônio 0,3 g, extrato de levedura 0,5 g, 1,6 mL de ácido sulfúrico a 50%, 1 ml de solução de traços de metal modificada a 1.000X. Todos os componentes foram adicionados em conjunto e dissolvidos em água desionizada. Essa solução foi termicamente esterilizada (123 ℃ por 20 minutos). O pH foi ajustado par a 7,0 com hidróxido de amônio (28%) e levado ao volume. 10 g de Glicose, 8 mL de Solução de Vitamina, e antibióticos foram adicionados após a esterilização e o ajuste de pH.

[00328] **Solução de metais-traço modificada a 1.000X** (por litro): Ácidos cítricos * H2O 40 g, MnSO4 * H2O 30 g, NaCl 10 g, FeSO4 * 7H2O 1 g, CoCl2 * 6H2O 1 g, ZnSO * 7H2O 1 g, CuSO4 * 5H2O 100 mg, H3BO3 100 mg, NaMoO4 * 2H2O 100 mg. Cada componente foi dissolvido um por vez em água desionizada, o pH foi ajustado em 3,0 com HCl/NaOH, e, então, a solução foi levada ao volume e esterilizada por filtro com um filtro de 0,22 mícron.

[00329] **Solução de vitamina** (por litro): 1,0 g de cloridrato de tiamina, 1,0 g de D-(+)-biotina, 1,0 g de ácido nicotínico, 4,0 g de cloridrato de piridoxina. Cada componente foi dissolvido um por vez em água de-

sionizada, o pH foi ajustado em 3,0 com HCl/NaOH, e, então, a solução foi levada ao volume e esterilizada por filtro com filtro de 0,22 mícron.

[00330] **Solução salina macro** (por litro): 296 g de MgSO4 * 7H2O, 296 g de monoidrato de ácido cítrico, 49,6 g de citrato férrico de amônio. Todos os componentes foram dissolvidos em água, q.s. para o volume e esterilizados por filtração com filtro de 0,22 mícron.

[00331] **Solução de alimentação** (por quilograma): 0,590 kg de glicose, 0,393 kg de H2O desionizada, 7,4 g de K2HPO4, e 8,9 g de Foamblast882 100%. Todos os componentes foram misturados juntos e autoclavados. Após autoclavagem da solução de alimentação, os suplementos de nutrientes são adicionados ao tubo de alimentação em uma capela estéril. As adições pós-esterilização à alimentação são (por quilograma de solução de alimentação), 5,54 ml de solução salina macro, 6,55 ml de solução de vitamina, 0,82 ml de solução de metais-traço modificada a 1.000X.

[00332] Este experimento foi realizado em pH 7,0 e temperatura de 34 ℃. Um frasco congelado da cepa de *E. coli* foi descongelado e inoculado em um frasco com meio de triptona-extrato de levedura e os antibióticos adequados. Após o inóculo crescer para uma densidade óptica de 1,0, medida a 550 nm (OD550), 500 mL foram usados para inocular um biorreator de 15 L e levar o volume inicial do tanque para 5 L. O meio em batelada tinha glicose em batelada a 9,7 g/L. A indução foi obtida pela adição de isopropil-beta-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) em uma concentração final de 200 μM quando as células estavam em uma OD_{550} de 6. Uma vez que a glicose foi consumida pela cultura, como assinalado por uma elevação no pH, a solução de alimentação de glicose foi alimentada para atender as demandas metabólicas em taxas menores que ou iguais a 10 g/min. A fermentação foi executada por tempo suficiente para determinar o máximo rendimento em massa de isopreno relativo à glicose, um total de 48 a 72 h de

tempo decorrido de fermentação.

[00333] O nível de isopreno no efluente gasoso do biorreator foi determinado usando um espectrômetro de massa iSCAN (Hamilton Sundstrand). O gás de entrada era uma mistura adaptada de oxigênio e nitrogênio (~9,3 %, em volume e 90,7 %, em volume, respectivamente). As concentrações de citrato, glicose, acetato, e mevalonato no caldo de fermentação foram determinadas em amostras de caldo tomadas a intervalos de 4 horas por análise de HPLC. As concentrações em amostras de caldo foram determinadas por comparação da resposta do índice de refração versus uma curva de calibração previamente gerada usando um padrão de uma concentração conhecida.

RESULTADOS

[00334] A fermentação com a etiqueta proteolítica na cepa ispA (CMP1059) tinha um índice de produtividade celular 11% mais elevado em relação à cepa de controle (CMP1043) que usa a proteína ispA selvagem. Adicionalmente, a fermentação com a etiqueta proteolítica na cepa ispA (CMP1059) tinha uma produtividade específica de pico de isopreno 14% maior (a 16 h EFT) em relação à cepa de controle (em 16 h EFT, CMP1043) que usa a proteína ispA selvagem.

Exemplo 11: Dados metabólicos em cepas contendo uma modificação de ispA

[00335] Os testes de fermentação foram feitos para testar o acúmulo de metabólitos nas cepas CMP1059 e CMP1082 assim como na cepa de controle CMP1043 de acordo com o protocolo descrito nos exemplos 9 e 10.

[00336] **Análise de metabólitos**: A extração de metabólitos de *E. coli.* foi obtida por retirar aproximadamente 3 mL de cultura para um tubo cheio com 9 mL de metanol gelado seco. As amostras resultantes foram pesadas para calcular a quantidade de caldo de amostragem e, em seguida, armazenadas a -80 ℃ até análise posterior. Para a extra-

ção e concentração de metabólito, alíquotas de 0,5 mL de suspensão de células (uma alíquota de 1 mL foi usada caso a densidade celular da cultura medida como OD_{600} estivesse abaixo de 50) foram diluídas com 2,5 mL de mistura de metanol/tampão de acetato de amônio (5 mM, pH=8,0) (6:1, v/v) e os restos de células foram peletizados por centrifugação por 5 minutos. O sobrenadante foi coletado e carregado em colunas Strata-X-AW da Phenomenex (33 µm de 30 mg/3 mL de Troca Aniônica Fraca Polimérica). O pélete de células foi extraído mais duas vezes, primeiro com 3 mL da mistura de metanol/tampão de acetato de amônio (5 mM, pH=8,0) (6:1 v/v), e, em seguida, com 3 mL de mistura de metanol/tampão de acetato de amônio (5 mM, pH=8,0) (1:1 v/v). Nas duas vezes as células foram peletizadas por centrifugação, e os sobrenadantes resultantes foram consecutivamente carregados nas mesmas colunas Strata-X-AW. Durante a extração-centrifugação, as amostras com as células foram mantidas abaixo de 4 ℃. Após a lavagem das colunas com 1 mL de água e 1 mL de metanol, os metabólitos de interesse foram eluídos das colunas primeiramente com 0,3 mL de mistura de NH_4OH/metanol concentrada (1:14, v/v) e, então, com 0,3 mL de mistura de NH_4OH/metanol/água concentrada (1:12:2, v/v/v). O eluente resultante foi neutralizado pela adição de 20 µL de ácido acético glacial e, em seguida, clarificado por centrifugação.

[00337] A análise de metabólitos foi realizada por espectrometria de massa com o uso de um sistema TSQ Quantum Access TSQ (Thermo Scientific). Todo o controle do sistema, aquisição de dados e avaliação de dados espectrais de massa foram realizados com o uso do software XCalibur e LCQuan (Thermo Scientific). Para o método LC-ESI-MS/MS, uma coluna de HPLC quiral de 5 µM Nucleodex β-OH (100×2 mm, Macherey-Nagel, Alemanha) foi usada com um cartucho de guarda de CC 8/4 Nucleodex beta-OH. Um gradiente de fase móvel foi aplicado, no qual a fase móvel A era tampão de acetato de amônio 100 mM

(grau SigmaUltra, Sigma) (pH=8) em água de grau MilliQ, a fase móvel B era água de grau MilliQ, e a fase móvel C era acetonitrila de grau de LC-MS (Chromasolv, Riedel-de Haën). As temperaturas da coluna e da bandeja da amostra foram reduzidas para 5 ℃ e 4 ℃, respectivamente. O volume de injeção foi 10 µL.

[00338] A detecção de massa foi realizada com o uso de ionização por eletrospray no modo negativo (tensão de aspersão de ESI de 3,0 kV e a temperatura do tubo de transferência de íons de 390 ℃). Os seguintes valores de m/z para íons precursores foram selecionados para detectar os metabólitos de interesse no modo SRM: 245,0 para IPP e DMAPP, 313,1 para GPP, e 381,1 para FPP. As concentrações dos metabólitos foram determinadas com base nas intensidades integradas dos picos gerados pelo íon de PO_3^- produto (m/z =79,0). As curvas de calibração obtidas por injeção de padrões foram usadas para calcular as concentrações de metabólitos nos extratos celulares. Os padrões de IPP, DMAPP, GPP, e FPP foram comprados junto à Echelon Biosciences Inc. As concentrações intracelulares dos metabólitos foram determinadas com base na presunção de que em 1 mL da cultura a OD_{600}=200 o volume integrado de todas as células é 50 µL.

RESULTADOS

TABELA 7: Quantidade máxima de metabólitos observada ao longo do curso de 48 horas. Os valores de metabólito mostrados foram corrigos para od_{600}.

Cepa	FPP	GPP	IPP	DMAPP
Cepa de controle CMP1043	3,675	2,648	16,747	51,543
CMP1082 Cepa PyddV-ispA	0,355	0,484	36,393	110,744
CMP1059 – Etiq. Prot.	0,318	0,546	13,356	16,280

Exemplo 12: Troca de farnesil difosfato sintase selvagem de *E. coli* por uma farnesil difosfato sintase de ave modificada.

[00339] De modo a aumentar a partição de carbono de DMAPP para isopreno ao invés de para isoprenoides inferiores, pode ser útil usar uma farnesil difosfato sintase com um valor de Km maior para DMAPP. Estas enzimas são descritas em Fernandez, S. et al., 2000, *Biochemistry*, 39(50):15316-15321. Consequentemente, a farnesil difosfato sintase de *E. coli* selvagem é substituída pela enzima de ave que tem a mutação A116W ou N144'W.

[00340] Para preparar esta cepa, três pedaços de DNA foram gerados por PCR. O pedaço 1 contém uma sequência de 15 bp que permite união pelo kit sem emendas (Invitrogen) a um vetor pBBR1MCS5 digerido com XbaI/EcoRI (Kovach et al. 1995, *Gene* 166:175-176), uma região homóloga à região de yhfS de BL21, um marcador de canamicina, e 15 bp que permitem união ao promotor do operon xseB-ispA-dxs. Os iniciadores usados para se obter este pedaço são CMP247 (5'-gcggtggcggccgctttgtcatcggttaacgctggaacacctgccgcgcgcaacgttgccagcacctccttagttcctattccgaagttc -3' (SEQ ID NO:58)) e CMP248 (5'-gctggagctgcttcgaagttcc-3' (SEQ ID NO:59)), e o molde é pKD4 (Datsenko e Wanner, *supra*). O pedaço 2 contém o promotor o operon xseB-ispA-dxs. Os iniciadores usados para se obter este fragmento foram CMP249 (5'- cgaagcagctccagcgaacaatttaatgataaacttcatggcg-3' (SEQ ID NO:60) e CMP250 (5'- AATGAATGTCTGACTCTCAATATTTTTCGC-3' (SEQ ID NO:61)), e o molde é DNA cromossômico de BL21 ou um derivado do mesmo. Iniciadores foram projetados para permitir união sem emendas ao pedaço 1 e ao pedaço 3. O pedaço 3 contém o gene de farnesil difosfato sintase de ave, alelo A166W ou N144'W, e dois conjuntos de 15 bp permitindo união com o pedaço 2 e pBBR1MCS5 digerido por XbaI e EcoRI. Os iniciadores usados para

se obter este fragmento são CMP343 (5'-ATAAGCTTGATATCGacctgtcggcactgaagcaggtcgtcgacgagcaacaaccgg atgcggcgTCATTTCTGGCGTTTGTAGATCTTC-3' (SEQ ID NO:62)) e CMP344 (5'-agtcagacattcattatgcataaatttactggtgtcaatg-3' (SEQ ID NO:63), e o molde é o plasmídeo pA166W para o alelo A166W e o plasmídio pN144'W para o alelo N144'W (Fernandez, S. et al., *supra*).

[00341] As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram todas feitas usando Herculase II Fusion de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante (Agilent, Santa Clara, CA, EUA). Elas foram purificadas usando o kit de purificação de PCR da Qiagen (Germantown, MD, EUA).

[00342] Os pedaços 1, 2 e 3 foram então unidos com o plasmídeo pBBR1-MCS5 digerido por EcoRI/XbaI usando o kit de clonagem e união sem emendas GeneArt (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. A reação foi transformada em células *E. coli* Top10 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), e os transformantes foram selecionados em LB + 20 mg/L de canamicina. O plasmídeo foi isolado de uma destas colônias, e designado pCMP1093 para o alelo A166W e pCMP1094 para o alelo N144'W. A presença do construto da direita no plasmídeo foi confirmada por sequenciamento (Quintara Bio, Albany, CA, EUA). Os plasmídeos pCMP1093 e 1094 foram usados como um molde para uma reação de PCR usando os iniciadores CMP257 (5'-cattcgcgccgcattcacagccgattcgagccaccttcatcaccgcatagttgtcatcggttaacgc tggaacac-3' (SEQ ID NO:64)) e CMP258 (5'-GGTTATTATTGAGCAGATGGGGCTGACGCTTATTACTGTTGATTTC AATGACCTGTCGGCACTGAAGCAGG-3' (SEQ ID NO: 65)). Os produtos de PCR foram purificados usando o kit de purificação de PCR Qiagen (Germantown, MD, EUA) e digeridos com a enzima de restrição DpnI. Após purificação adicional, estes produtos de PCR foram

usados em uma reação de recombinação (Datsenko e Wanner, *supra*) com a cepa CMP1018. Os transformantes foram selecionados em LB + 10 mg/L de canamicina. Colônias com o tamanho correto por PCR (usando os iniciadores CMP267 (5'-cgattcgagccaccttcatcacc-3' (SEQ ID NO:66)) e CMP268 (5'-CAG CGTCTTCTGGTGCATGACG-3' (SEQ ID NO:67))) foram designadas CMP1101 e CMP1102 respectivamente. O marcador de canamicina foi espiralizado com pCP20 (Datsenko e Wanner, *supra*) para fazer CMP1107 e CMP1108 respectivamente. Para se obter a estrutura espiralizada, uma colônia transformada com pCP20 (cultivada a 30 ℃ com 50 mg/L de carbenicili na) foi aplicada por estriamento em LB e cultivada a 42 ℃ de um dia para o outro. No dia seguinte, as colônias foram selecionadas e colocadas em LB e LB + 10 mg/L de canamicina. Uma colônia com o marcador espiralizado cresce em LB mas não em LB + 10 mg/L de canamicina. Os plasmídeos MCM82 e pCHL243 foram eletroporados em CMP1107 e 1108 concomitantemente. Para cada, uma colônia que cresce em LB + 50 mg/L de carbenicilina e 50 mg/L de espectinomicina foi selecionada e denominada CMP1112 e CMP1113, respectivamente.

Exemplo 13: Construção de cepas com um promotor induzível convergente atrás de ispA

[00343] Um método alternativo para diminuir a expressão de ispA em um dado momento é colocar um promotor induzível convergente a jusante do gene. Este método foi aplicado de forma bem sucedida para diminuir a expressão de pykF (Krylov *et al.*, 2010, *J Mol Microbiol Biotechnol*, 18:1-13).

[00344] Em uma modalidade, um promotor de Trc é inserido a jusante de *ispA* na cepa CMP1018. Os plasmídeos MCM82 (consulte Publ. U.S. n° 2011/0159557) e pCHL243 são eletropor ados concomitantemente na cepa. Uma colônia que cresce em LB + 50 mg/L de carbenicilina e 50 mg/L de espectinomicina foi selecionada e denomi-

nada CMP1112 e CMP1113, respectivamente. Mediante indução com IPTG, o promotor de Trc é induzido, diminuindo assim a expressão de IspA.

Exemplo 14: Utilização de RNA antissenso para diminuir a expressão de IspA

[00345] A tecnologia de RNA antissenso apresenta metodologia para se obter atenuação de um gene alvo. Ela foi usada em *E. coli*, entre outros organismos, para reduzir a produção de acetato (Kim J. e Cha H.J., 2003, *Biotech Bioeng*., 283:841-853) ou para manipular um fenótipo de supressão de catalase (Chan E. *et al.*, 2010, *J. Exp. Microbiol Immunol*., 14:127-134).

[00346] O design de construtos antissenso direcionados ao gene ispA de *E. coli* pode ser preparado usando métodos descritos por Shao Y. *et al*., 2006, *Nucleic Acids Res*., 34:5660-5669. As moléculas de RNA antissenso podem ser estabilizadas usando terminações emparelhadas (Nakashima N. *et al.*, 2006, *Nucleic Acids Res*., 34:e138). Estes construtos são colocados no final do operon em MCM82 ou pCHL243. O uso destes construtos de RNA antissenso resultará em rendimento aumentado de isopreno.

Exemplo 15: Redução da expressão de ispA através da proteína repressora heteróloga HrcA

[00347] Um método alternativo para controlar a expressão de *ispA* é usar o repressor transcricional HrcA de *Caulobacter crescentus* anteriormente identificado (Roberts et al., 1996, *Journal of Bacteriology*, 178(7):1829-1841; Susin *et al.*, 2004, *Journal of Bacteriology*, 186(20):6759-6767). O gene que codifica HrcA não é encontrado naturalmente em muitos micro-organismos (por exemplo, *E. coli*) e não se acredita que o elemento CIRCE, que é reconhecido por HrcA, esteja envolvido em reger a expressão gênica nesses micro-organismos. Portanto, a incorporação do elemento CIRCE dentro da sequência regula-

tória que rege a expressão de *ispA* permitirá a repressão mediada por HrcA de *ispA*. Além disso, o gene *hrcA* heterólogo pode ser introduzido em que sua expressão será regida por ao menos um dentre vários meios rigidamente regulados. Esta configuração reguladora manipulada resultará na indução da expressão de *hrcA* em um período definido durante a fase de crescimento lenta ou fase de produção de isopreno alta da fermentação. Para exemplificar estes métodos, os seguintes exemplos de sistemas de controle da expressão gênica rigidamente regulados são descritos.

[00348] De modo a eliminar os efeitos a jusante sobre a expressão do gene essencial *dxs*, um processo em duas etapas é utilizado. Primeiro, a metade 5' de *ispA* é removida do lócus endógeno usando métodos-padrão, como a tecnologia GeneBridges (Heidelberg, Alemanha). Isto permite a expressão normal dos genes ligados *xseB* e *dxs* para permanecerem intactos no lócus nativo, que forma um operon de genes três; *xseB-ispA-dxs* (consulte a base de dados Ecocyc, ecocyc.org). Em segundo lugar, buscas pelo promotor usando a ferramenta online SoftBerry BPROM- predição de promotores bacterianos (http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=bprom&group=programs &subgroup=gfindb) preveem um promotor de dependente de sigma-70 que governa a expressão *dxs* para estar presente na metade 3' do gene *ispA*. Esta deleção de *ispA* proposta ocorre após a introdução do alelo randomizado de *ispA* regido por HrcA descrito diretamente abaixo.

[00349] Uma sequência que codifica uma versão com randomização de códon de *ispA* (vide **Figura 8**) obtida junto à Gene Oracle (Mountain View, CA, EUA) regida por um promotor regulado por HrcA é introduzida no cromossomo de uma cepa de *E. coli* produtora de isopreno usando técnicas GeneBridges padrão. De modo a otimizar a produção de isopreno, o teste de duas opções de promotor para a

produção de isopreno pode ser feito. A opção que produz os mesmos níveis de *ispA* que com a cepa com lócus de *ispA* selvagem durante a fase de crescimento é escolhida para uso futuro. As duas opções de promotor incluem: opção de promotor 1) uma porção da sequência regulatória a montante de *xseB* que supostamente direciona a expressão do operon de 3 genes com um elemento CIRCE introduzido em posição imediatamente 3' do início previsto da transcrição; e opção de promotor 2) uma porção da região regulatória a montante de *ispA* que abrange parte da sequência codificante de *xseB* e é prevista pela ferramenta online SoftBerry BPROM- predição de promotores bacterianos com um elemento CIRCE introduzido em posição imediatamente 3' do início previsto da transcrição. A sequência do elemento CIRCE e a colocação dentro do promotor planejado para reger a expressão de *ispA* são derivadas de informações fornecidas na figura 10 de Baldini *et al.*, 1998, *Journal of Bacteriology*, 180(7):1632-1641.

[00350] Para a opção de promotor 1), a base em negrito sozinha é o suposto início de transcrição, a sequência sublinhada é o elemento CIRCE descrito na referência (Baldini *et al.*, *supra*), onde o que está em negrito e sublinhado são os braços esquerdo e direito da repetição invertida do elemento CIRCE, as letras minúsculas em negrito são o RBS previsto, e o atg em letra minúscula é o códon de iniciação.

[00351] CTAACATCGCTTTGCTGTGCACATC-
CCTTACCATTGCGCGTTATTTGCTATTTG
CCCTGAGTCCGTTACCATGACGGG**G-**
G**<u>GTTGGCACTC</u>**AATGGAG**<u>CGACTGC-
AAC</u>**AAAAATATTG**agag**TCAGACATTCATTatg (opção de promotor 1) (SEQ ID NO:68).

[00352] Para a opção de promotor 2), a base em negrito sozinha é o suposto início de transcrição, a sequência sublinhada é o elemento CIRCE descrito na referência (Baldini et al., *supra*), onde o que está

em negrito e sublinhado são os braços esquerdo e direito da repetição invertida do elemento CIRCE, as letras minúsculas em negrito são o RBS previsto, e o atg em letra minúscula é o códon de iniciação.

[00353] GAGTTCGAACGCGGCGTGC AGCTGGCACG TCAGGGGCAG GCCAAATTAC AACAAGCCGA ACAGCGCGTACA-AATTCTGC **T**GTC**GTTGGCACTC**AATGGAGC**GACTGCTAAC**TGA-CAA TGAAGACGCC TCTCTAACCC CTTTTACACC **ggac**AATGAG-TAatg (opção de promotor 2) (SEQ ID NO:69)

[00354] Um códon otimizado para expressão no alelo de *E. coli* de *hrcA* pode ser obtido junto à Gene Oracle (Mountain View, CA, EUA), vide **Figura 18** para a sequência de nucleotídeos. Conforme anteriormente discutido, o promotor preciso que rege a expressão do repressor HrcA pode ser derivado de inúmeros atributos fisiologicamente relevantes de um sistema produtor de isopreno de *E. coli*. Em um destes casos, o promotor Tac regulado por IPTG pode ser usado para expressar PTac-*hrcA* a partir de um vetor plasmidial derivado de pK184 (Jobling et al., 1990, *Nucleic Acids Res.*, 18(17):5315-5316). O construto PTac-*hrcA* é movido para a opção de promotor de Δ*ispA* 1)- antecedente de *ispA* randomizado e a opção de promotor de Δ*ispA* 2)- antecedente de *ispA* randomizado através de técnicas de eletroporação padrão e selecionado em placas com antibiótico adequadas, como placas de meio LB com 50 µg/mL de canamicina. Um conjunto de colônias resistentes à canamicina resultantes são isoladas e submetidas à avaliação adicional para avaliar os potenciais benefícios, como produção de isopreno intensificada.

[00355] Para o promotor Tac, as letras minúsculas em negrito são o RBS previsto e o atg em letra minúscula é o códon de iniciação. TGTTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGC GGATAACAATTTCACACAGGAAACA-ATTACGGATCCCT**ggag**TTTAAACATatg (promotor Tac) (SEQ ID

NO:70).

[00356] Anticorpos contra IspA podem ser usados para monitorar o acúmulo de IspA dentro de culturas líquidas. Opcionalmente, anticorpos contra HrcA podem ser usados para monitorar os níveis de repressor de modo a validar a funcionalidade desta proteína dentro do hospedeiro. A expressão e a função bem sucedida do repressor de HrcA dentro de uma célula hospedeira produtora de isopreno junto com a repressibilidade de HrcA das opções de promotor 1) e 2) projetadas serão refletidas pelos níveis de IspA após a adição de IPTG. Se as opções 1) e 2) de promotor podem ser reprimidas através da ligação de HrcA ao elemento CIRCE, então, será observado um acúmulo reduzido de IspA. Esta observação estará inversamente correlacionada aos níveis de indutor de IPTG adicionados à cultura.

[00357] As células podem ser monitoradas microscopicamente para quaisquer fenótipos associados com níveis reduzidos de IspA. Adicionalmente, a célula pode ser monitorada para determinação da taxa de crescimento. Espera-se que níveis significativamente reduzidos de IspA resultem em crescimento mais lento e sub- suficiente ou espera-se que a perda do acúmulo de IspA pare o crescimento e reduza a viabilidade celular. Além disso, qRT-PCR da opção 1) de promotor ΔispA - ispA randomizado e da opção 2) de promotor de ΔispA - antecedentes de ispA randomizado, pode ser feito para determinar quais níveis de IspA e ispA mRNA são gerados por cada opção de promotor na ausência da expressão de HrcA. Estas informações junto com o crescimento e o comportamento das cepas irá ajudar a guiar qual promotor fornece controle ótimo da expressão.

Exemplo 16: Expressão de *ispA* regulada por xilose

[00358] Conforme descrito aqui, a menor expressão de *ispA* pode aumentar substancialmente o rendimento de isopreno produzido a partir de glicose por células manipuladas para produzir isopreno. A ex-

pressão gênica regulada mediada pela disponibilidade da fonte de carbono é uma outra alternativa escalonável para controlar a expressão de *ispA* dentro do hospedeiro de produção. Este método oferece a capacidade de fornecer níveis relativamente normais e/ou suficientes da expressão de *ispA* necessária para células saudáveis e robusta em rápido crescimento, permitindo rápida colocação de biomassa. Além disso, este método oferece a capacidade de restringir a expressão de *ispA* durante a importante janela de produção de isopreno suportada por glicose quando se acredita que a atividade da IspA seja prejudicial para a viabilidade celular, resultando em rendimento reduzido do isopreno produzido a partir da glicose. O uso da expressão gênica regulada pela fonte de carbono é economicamente possível em grande escala, onde indutores químicos como IPTG podem se mostrar caros.

[00359] Em um exemplo, a expressão de *ispA* em uma cepa hospedeira produtora de isopreno é colocada sob o controle direto dos promotores de *xylA* ou *xylF* endógenos à *E. coli* ou sob o controle de qualquer promotor que seja influenciado positivamente por uma D-xilose e influenciado negativamente pela glicose dentro de uma célula manipulada de *E. coli* produtora de isopreno. Isto é realizado pela deleção do gene *ispA* endógeno e substituição de um *ispA* heterólogo sob o controle de promotores responsivos à D-xilose de *xylA* ou *xylF*. Os promotores divergentes *xylA-xylF* de *E. coli* e sua regulação positiva através de D-xilose e do ativador transcricional XylR assim como sua regulação negativa pela glicose e repressão de catabólito foram descritos (S. Song e C. Park, 1997, *J. Bacterial.*, 179(22):7025-7032). Nestas células, a atividade de ispA é regida positivamente pela disponibilidade da xilose na ausência de glicose e negativamente pela presença de glicose. O lócus de *ispA* induzível por xilose está presente dentro do cromossomo do hospedeiro, mas alternativamente, pode, também, ser codificado em uma sequência de nucleotídeos extracro-

mossômica como um plasmídeo. A construção do construto de *ispA* induzível por xilose e sua introdução no hospedeiro de *E. coli* produtor de isopreno podem ser feitos usando técnicas moleculares e de microbiologia padrão (J. Sambrook, E. F. Fritsch, e T. Maniatis Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY. 1989).

[00360] O crescimento da cepa produtora de isopreno carregando *ispA* com promotor de *xylA* ou *ispA* com promotor de *xylF* como o único lócus que codifica atividade de IspA é feito inicialmente na presença de D-xilose como a única fonte de carbono. No momento desejado no teste de fermentação, a glicose é introduzida no fermentador, que reprime eficazmente a expressão de *ispA* e permite a rápida transição da respiração para ser direcionada pelo metabolismo de glicose. A glicose permanece a fonte de carbono utilizada para a produção de isopreno pelo restante do teste de fermentação. Na presença de glicose, a transcrição diminuída do lócus de *ispA* com promotor *xylA* ou de *ispA* com promotor de *xylF* e a meia-vida intrínseca do IspA codificado anteriormente expresso na ausência de glicose resulta na perda significativa de atividade de IspA durante a janela de produção de isopreno sustentada por alto teor de glicose, acentuando a viabilidade celular e permitindo rendimento aprimorado do isopreno gerado a partir de glicose pela cepa hospedeira produtora de isopreno.

Exemplo 17: Construção da cepa CMP1136 (- PGL)

[00361] Um produto de PCR contendo um cassete de canamicina flanqueado por sítios de FRT e regiões homólogas a montante e a jusante de pgl (ybhE) foi obtido, com o uso do método de PCR descrito no Exemplo 4, cepa Keio JW0750 (Baba *et al.* 2006. *Mol. Syst. Biol.* 2:1-11) que um cassete de canamicina no lócus pgl, e os iniciadores pglAmpF (5'- cagcaaatagcaggtgtatccagc-3' (SEQ ID NO:71) e pglAmpR (5'- GCA ACC GAC TGT TGA TAG AAC AAC-3' (SEQ ID NO:72)). Este produto de PCR foi usado em uma reação de recombinação

(consulte o protocolo descrito acima) com CMP1075 de *E. coli* (supra. Uma colônia foi selecionada em LB + 10 mg/L de canamicina e denominada CMP1125. O marcador de canamicina foi removido com o uso do protocolo recomendado pelo fabricante (Gene Bridges, Heidelberg, Alemanha) para formar a cepa CMP1133.

[00362] CMP1133 foi verificada por PCR com os iniciadores pglAmpF (supra) e pglRecCheck (5'-GGT TAC AAA ATG ATT GGC GTA CGC-3' (SEQ ID NO:73)) para demonstrar a deleção do gene pgl. Os plasmídeos MCM82 e pCHL243 foram eletroporadaos em CMP1133 concomitantemente. Uma colônia que cresce em LB + 50 mg/L de carbenicilina e 50 mg/L de espectinomicina foi selecionada e denominada CMP1136.

Exemplo 18: Fermentação de grande escala de CMP1136

[00363] Este experimento foi realizado para avaliar a produção de isopreno a partir de *E. coli(BL21)* expressando genes introduzidos a partir da rota do mevalonato e cultivados em cultura de batelada alimentada na escala de 15 L. Uma cepa produtora de isopreno CMP1082 (HMB GI1.2gltA, PyddVIspA_GO, truncIspA, pMCM82, pDW72) foi executada em um processo de produção de isopreno padrão, descrito a seguir. As métricas de desempenho (rendimento de isopreno cumulativo relativo à glicose, rendimento instantâneo de isopreno relativo à glicose, produtividade volumétrica de isopreno, produtividade específica e índice de produtividade celular) são comparadas com uma cepa experimental CMP1136 (HMB GI1.2gltA, PyddVIspA_GO, truncIspA,pgl-, pMCM82, pDW72) que foi executada nas mesmas condições para verificar se qualquer aprimoramento no rendimento pode ser atribuído à deleção do gene pgl em CMP1136.

[00364] **Receita do meio** (por litro do meio de fermentação): K2HPO4, 7,5 g, MgSO4 * 7H2O, 2 g, monoidrato de ácido cítrico, 2 g, citrato férrico de amônio, 0,3 g, extrato de levedura, 0,5 g, 1,6 mL de

ácido sulfúrico a 50%, 1 ml de solução de traços de metal modificada a 1.00X. Todos os componentes foram adicionados em conjunto e dissolvidos em água desionizada. Esta solução foi esterilizada com aquecimento (123℃ por 20 minutos). O pH foi ajustado p ara 7,0 com hidróxido de amônio (28%) e levado ao volume. 10 g de Glicose, 8 mL de Solução de Vitamina, e antibióticos foram adicionados após a esterilização e o ajuste de pH.

[00365] **Solução de metais-traço modificada a 1000X** (por litro): 40 g de ácidos cítricos * H2O, 30 g de MnSO4 * H2O, 10 g de NaCl, 1 g de FeSO4 * 7H2O, 1 g deCoCl2 * 6H2O, 1 g de ZnSO * 7H2O, 100 mg de CuSO4 * 5H2O, 100 mg de H3BO3, 100 mg de NaMoO4 * 2H2O. Cada componente foi dissolvido um por vez em água desionizada, o pH foi ajustado em 3,0 com HCl/NaOH, e, então, a solução foi levada ao volume e esterilizada por filtro com um filtro de 0,22 mícron.

[00366] **Solução de vitamina** (por litro): 1,0 g de cloridrato de tiamina, 1,0 g de D-(+)-biotina, 1,0 g de ácido nicotínico, 4,0 g de cloridrato de piridoxina. Cada componente foi dissolvido um por vez em água desionizada, o pH foi ajustado em 3,0 com HCl/NaOH, e, então, a solução foi levada ao volume e esterilizada por filtro com filtro de 0,22 mícron.

[00367] **Solução salina macro** (por litro): 296 g de MgSO4 * 7H2O, 296 g de monoidrato de ácido cítrico, 49,6 g de citrato férrico de amônio. Todos os componentes foram dissolvidos em água, q.s. para o volume e esterilizados por filtração com filtro de 0,22 mícron.

[00368] **Solução de alimentação** (por quilograma): 0,590 kg de glicose, 0,393 kg de H2O desionizada, 7,4 g de K2HPO4, e 8,9 g de Foamblast882 a 100%. Todos os componentes foram misturados juntos e autoclavados. Após autoclavagem da solução de alimentação, os suplementos de nutrientes são adicionados ao tubo de alimentação em uma capela estéril. As adições pós-esterilização à alimentação são

(por quilograma de solução de alimentação), 5,54 ml de solução salina macro, 6,55 ml de solução de vitamina, 0,82 ml de solução de metais-traço modificada a 1.000X.

[00369] Este experimento foi realizado para monitorar a formação de isopreno a partir de glicose na fermentação a pH (7,0) e temperatura (34℃) desejados. Um frasco congelado da cepa de *E. coli* foi descongelado e inoculado em um frasco com meio de triptona-extrato de levedura e os antibióticos adequados. Depois que inóculo cresceu para a densidade óptica 1,0, medida a 550 nm (OD_{550}), 500 ml foram usados para inocular um biorreator de 15 L e levar o volume do inicial do tanque para 5 L.

[00370] Os meios de batelada tinham glicose em batelada a 9,7 g/L. A indução foi realizada pela adição de isopropil-beta-D-1-tiogalactopiranosida (IPTG). IPTG foi adicionada ao tanque para levar a concentração a 200 µM quando as células estavam em uma OD_{550} de 6. Uma vez que a glicose foi consumida pela cultura, como assinalado por uma elevação no pH, a solução de alimentação de glicose foi alimentada para atender as demandas metabólicas em taxas menores que ou iguais a 10 g/min. A fermentação foi executada por tempo suficiente para determinar o máximo rendimento em massa de isopreno relativo à glicose, um total de 68 a 72 h de tempo decorrido de fermentação.

RESULTADOS

[00371] A cepa pgl- (CMP1136) atingiu uma maior % de rendimento de isopreno em relação à glicose do que a cepa pgl+ (CMP1082). Vide **tabela 8** e **Figura 19**. A cepa pgl- (CMP1136) atingiu uma maior % de rendimento instantâneo de isopreno em glicose do que a cepa e pgl+ (CMP1082) e foi capaz de manter esta maior produtividade durante um período mais longo (~24 h no máximo para pgl- versus ~12 h no máximo para pgl+). Vide **tabela 8** e **Figura 20**. A cepa pgl- (CMP1136)

atingiu um maior índice de produtividade celular do que a cepa pgl+ (CMP1082). No final da fermentação de 68 a 72 h, a cepa pgl- teve um CPI muito maior. Além disso, no momento do rendimento cumulativo máximo de isopreno em glicose (44 h para a cepa pgl+ e 56 h para a cepa pgl-) o CPI é maior em uma a cepa pgl-. Vide **tabela 8** e **Figura 21**. A cepa pgl- (CMP1136) atingiu aproximadamente a mesma produtividade volumétrica total que a cepa pgl+ (CMP1082). Vide **tabela 8** e **Figura 22**. A cepa pgl- (CMP1136) atingiu aproximadamente a mesma produtividade específica que a cepa pgl+ (CMP1082). Entretanto, a cepa pgl- (CMP1136) foi capaz de manter alta produtividade durante um período mais longo do que a cepa pgl+ (CMP1082) foi notavelmente melhor no final da fermentação. Vide **tabela 8** e **Figura 23**.

TABELA 8: Métricas de produtividade de isopreno

Descrição da cepa/ Número de testes	Conc. de oxigênio de entrada (%, em volume)	% de rendimento instantâneo de pico de isopreno em relação à glicose (g/g%)	Produtividade volumétrica de isopreno total (g/L/h) no momento do rendimento de isopreno total máximo	Total máximo % de rendimento de isopreno em relação à glicose (g/g)	CPI (g de isopreno/ gDCW) no tempo de máximo rendimento total de isopreno	Produtividade específica de pico (mg isopreno/ L/h/OD)
CMP1082 / 20111110	9,3%	20,1	1,91	16,3	1,81	30,31
CMP1136 / 20111225	9,3%	22,3	1,82	17,2	2,73	28,61

Exemplo 19: Produção de Isopreno a partir de *E. coli* expressando genes da rota de MVA superior

[00372] Este exemplo avaliou a produção de isopreno em *E. coli (BL21)* expressando genes introduzidos a partir da rota de mevalonato e cultivados em cultura de batelada alimentada na escala de 15 L. Os genes para as enzimas da rota superior de MVA vêm de *E. faecalis* (cepa DW709 e DW717), *E.casseliflavus* (DW718) ou *E.gallinarum* (DW719, MCM2158 (BL21 t pgl, GI1.2gltA pgl-,yhfSFRTPyddVIspAyhfS thiFRT-truncIspA, FRT-PL.2-2cis-RBS10000-MVK(burtonii)-KDyI + pTrcAlba-MVKdel2 + pCL-Ptrc-Upper_Egallinarum)).

MATERIAIS E MÉTODOS

[00373] **Construção da cepa**: As cepas DW709, DW717, DW718, e DW719 foram geradas por cotransformação de um plasmídeo abrigando uma variante de isopreno sintase (IspS) e um de quatro plasmídeos abrigando diferentes rotas de MVA superior em uma cepa hospedeira de produção de *Escherichia coli*. De acordo com técnicas-padrão de biologia molecular, a célula hospedeira CMP1133 (BL21 Δpgl PL.2mKKDyI GI1.2gltA yhfSFRTPyddVIspAyhfS thiFRTtruncIspA) foi eletroporada com pDW240 (pTrc P. alba IspS MEA -mMVK (Carb50)), transportando uma variante *IspS*, e quer pMCM82 (publicação de pedido de patente US n° 2009/0203102), pCHL276 (*pCL_pTrc-superior(E. faecalis)-sem líder)*, pCHL277 (*pCL_pTrc-superior(E. casseliflavus)-sem líder)*, ou pMCM1225 (pCL-Ptrc-Upper_*E.gallinarum*). As células foram recuperadas e colocadas em placas em meio seletivo, e os tranformantes individuais, resistentes à espectinomicina e carbenicilina, resultaram nas cepas DW709, DW717, DW718, e DW719. Estas cepas produtoras de isopreno expressaram uma variante de IspS e qualquer dentre a rota de MVA superior de *Enterococcus faecalis*, a rota de MVA superior sem líder de *Enterococcus faecalis*, a rota de MVA superior de *Enterococcus casseliflavus*, ou a rota de MVA superior de *Enterococcus gallinarum*,

respectivamente (consulte a Tabela 9). A cepa MCM2065 foi eletroporada com o plasmídio pMCM2149 e os transformantes foram selecionados em placas LA carb50 à temperatura ambiente durante três dias. Uma única colônia foi cultivada até o log médio em LB carb50, congelada e armazenada em 33% de glicerol a -80 como MCM2152. MCM2152 foi eletroporada com o plasmídio pMCM1225 e os transformantes foram selecionados em placas LA carb50 spec50. Uma única colônia foi cultivada até o log médio em LB carb50 spec50, colocada em glicerol 33% e congelada como MCM2158.

TABELA 9: Cepas produtoras de isopreno

Nome da cepa	Genótipo	Hospedeiro original	Plasmídeos
DW709	BL21 GI1.2gltA PL.2 MKKDyI t pgl pgl-, yhfSFRTPyddVIspA-yhfS thiFRTtruncIspA, p-Trc(variante de IspS)_mMVK, pCLPtrcSuperior_E.faecalis	CMP1133	pDW240, pMCM82
DW717	BL21 GI1.2gltA PL.2 MKKDyI t pgl pgl-, yhfSFRTPyddVIspA-yhfS thiFRTtruncIspA, p-Trc(variante de IspS)_mMVK, pCLPtrcSuperi-or_E.faecalis_sem líder	CMP1133	pDW240, pCHL276
DW718	BL21 GI1.2gltA PL.2 MKKDyI t pgl pgl-, yhfSFRTPyddVIspA-yhfS thiFRTtruncIspA, p-Trc(variante de IspS)_mMVK, pCLPtrcSuperi-or_E.casseliflavus	CMP1133	pDW240, pCHL277
DW719	BL21 GI1.2gltA PL.2 MKKDyI t pgl pgl-, yhfSFRTPyddVIspA-yhfS thiFRTtruncIspA, p-Trc(variante de IspS)_mMVK, pCLPtrcSuperior_E.gallinarum	CMP1133	pDW240, pMCM1225

Nome da cepa	Genótipo	Hospedeiro original	Plasmídeos
MCM2158	BL21 t pgl, GI1.2gltA pgl-, yhfS-FRTPyddVIspAyhfS thiFRTtrun-clspA, FRT-PL.2-2cis-RBS10000-MVK(burtonii)-KDyI + pTrcAlba-MVKdeI2 + pCL-Ptrc-Upper_Egallinarum	CMP1133	pDW240

[00374] **Receita do meio** (**por litro de meio de fermentação**): K2HPO4, 7,5 g, MgSO4 * 7H2O, 2 g, monoidrato de ácido cítrico, 2 g, citrato férrico de amônio, 0,3 g, extrato de levedura, 0,5 g, 1,6 mL de ácido sulfúrico a 50%, 1 ml de solução de metais-traço modificada a 1.000X. Todos os componentes foram adicionados em conjunto e dissolvidos em água desionizada. Esta solução foi esterilizada com aquecimento (123℃ por 20 minutos). O pH foi ajustado p ara 7,0 com hidróxido de amônio (28%) e levado ao volume. 10 g de Glicose, 8 mL de Solução de Vitamina, e antibióticos foram adicionados após a esterilização e o ajuste de pH.

[00375] **Solução de metais-traço modificada a 1.000X (por litro)**: Ácidos cítricos * H2O, 40 g, MnSO4 * H2O, 30 g, NaCl, 10 g, FeSO4 * 7H2O, 1 g, CoCl2 * 6H2O, 1 g, ZnSO * 7H2O, 1 g, CuSO4 * 5H2O, 100 mg, H3BO3, 100 mg, NaMoO4 * 2H2O, 100 mg. Cada componente foi dissolvido um por vez em água desionizada, o pH foi ajustado em 3,0 com HCl/NaOH, e, então, a solução foi levada ao volume e esterilizada por filtro com um filtro de 0,22 mícron.

[00376] **Solução de vitamina** (**por litro**): Cloridrato de tiamina, 1,0 g, D-(+)-biotina, 1,0 g, ácido nicotínico, 1,0 g, cloridrato de piridoxina, 4,0 g. Cada componente foi dissolvido um por vez em água desionizada, o pH foi ajustado em 3,0 com HCl/NaOH, e, então, a solução foi levada ao volume e esterilizada por filtro com filtro de 0,22 mícron.

[00377] **Solução salina macro** (**por litro**): 296 g de MgSO4 * 7H2O,

296 g de monoidrato de ácido cítrico, 49,6 g de citrato férrico de amônio. Todos os componentes foram dissolvidos em água, q.s. para o volume e esterilizados por filtração com filtro de 0,22 mícron.

[00378] **Solução de alimentação** (**por quilograma**): 0,590 kg de glicose, 0,393 kg de H2O desionizada, 7,4 g de K2HPO4, e 8,9 g de Foamblast882 a 100%. Todos os componentes foram misturados juntos e autoclavados. Após autoclavagem da solução de alimentação, os suplementos de nutrientes são adicionados ao tubo de alimentação em uma capela estéril. As adições pós-esterilização à alimentação são (por quilograma de solução de alimentação), 5,54 ml de solução salina macro, 6,55 ml de solução de vitamina, 0,82 ml de solução de metais-traço modificada a 1.000X.

[00379] Este experimento foi realizado para monitorar a formação de isopreno a partir de glicose no pH de fermentação (7,0) e temperatura (34℃) desejados. Um frasco congelado da cepa de *E. coli* foi descongelado e inoculado em um frasco com meio de triptona-extrato de levedura e os antibióticos adequados. Depois que inóculo cresceu para a densidade óptica 1,0, medida a 550 nm (OD_{550}), 500 ml foram usados para inocular um biorreator de 15 L e levar o volume do inicial do tanque para 5 L. As cepas produtoras de isopreno foram testadas em um processo de fermentação de batelada alimentada.

[00380] Os meios de batelada tinham glicose em batelada a 9,7 g/L. A indução foi realizada pela adição de isopropil-beta-D-1-tiogalactopiranosida (IPTG). Uma dose de IPTG foi adicionada ao tanque para levar a concentração para 200 μm quando as células estavam em uma OD_{550} de 6. Uma vez que a glicose foi consumida pela cultura, como assinalado por uma elevação no pH, a solução de alimentação de glicose foi alimentada para atender as demandas metabólicas em taxas menores que ou iguais a 10 g/min. A fermentação foi executada por tempo suficiente para determinar o rendimento máximo

em massa de isopreno relativo à glicose, um total de 64 a 68 h de tempo decorrido de fermentação.

[00381] **Análise**: O isopreno é volátil e pode ser eficientemente varrido do tanque pelo gás de entrada. O nível de isopreno no biorreator de efluente gasoso foi determinado com o uso de dois espectrômetros de massa, um espectrômetro massa iSCAN (Hamilton Sundstrand), e um Hiden HPR20 (Hiden Analytical). Os níveis de Oxigênio, Nitrogênio e CO2 no efluente gasoso foram determinados pelas mesmas unidades de espectrometria de massa. O oxigênio dissolvido no caldo de fermentação é medido por sonda sanitária esterilizável com um sensor óptico fornecido pela Hamilton Company.

[00382] As concentrações de citrato, glicose, acetato, e mevalonato no caldo de fermentação foram determinadas em amostras de caldo tomadas a intervalos de 4 horas por análise de HPLC. As concentrações em amostras de caldo foram determinadas por comparação da resposta do índice de refração em função de uma curva de calibração previamente gerada usando um padrão de concentração conhecida.

RESULTADOS

TABELA 10: Métricas da produtividade de isopreno

Descrição da cepa / Número de testes	Produtividade volumétrica de isopreno Produtividade volumétrica de isopreno (g/L/h) (no rendimento de pico)	% de Rendimento de pico total em relação à glicose (g/g)	Produtividade específica de pico (mg de isopreno /L/h/OD)
DW709 / 20120108	1,89	16,35	26,0
DW717 / 20120131	1,97	16,46	27,7
DW718 / 20120132	2,44	17,54	37,6

Descrição da cepa / Número de testes	Produtividade volumétrica de isopreno Produtividade volumétrica de isopreno (g/L/h) (no rendimento de pico)	% de Rendimento de pico total em relação à glicose (g/g)	Produtividade específica de pico (mg de isopreno /L/h/OD)
DW719 / 20120133	2,38	18,16	34,3
MCM2158 / 20120409	2,11	17,35	38,6
CMP1043 Cepa de controle	1,69	14,26	26,87 (a 16 h EFT)

[00383] Como resumido na Tabela 10, em comparação com as fermentações usando a rota de MVA superior de *E. faecalis*, fermentações usando qualquer uma das enzimas da rota de MVA superior de *E. gallinarum* ou *E. casseliflavus* exibiram maior rendimento em massa total (**Figura 24**), maior produtividade volumétrica de pico (**Figura 25**), maior produtividade específica de pico (**Figura 26**). Adicionalmente, os níveis de acetil-Co-A nas células foram menores quando a cepa abrigou uma rota de *E. casseliflavus* ou *E. gallinarum* (Tabela 11). Esta redução nos níveis de acetil-CoA é indicativa de aumento do fluxo de carbono na rota de MVA nas células.

TABELA 11: Níveis de acetil-CoA (mM) em torno de 24 h de tempo decorrido de fermentação (EFT) nas cepas de antecedentes idênticos mas com diferentes rotas de mevalonato superior tendo as rotas de MVA superior de *E. gallinarum* ou *E. casseliflavus*.

Superior	*E. faecalis* (DW717) – 20 h	*E. casseliflavus* (DW718) -24 h	*E. gallinarum* (DW719) – 24 h
Acetil-CoA (mM)	6,34	3,57	3,56

Exemplo 20: Projetos de sítios de ligação ribossomais (RBSs) pa-

ra modificar a expressão de IspA

[00384] O software de otimização de calculadora de RBS foi usado com os parâmetros termodinâmicos de RNA calculados usando o pacote Vienna RNA v.1.8.4 (http://www.tbi.univie.ac.at/~ivo/RNA/, Andreas R. Gruber, Ronny Lorenz, Stephan H. Bernhart, Richard Neuböck, and Ivo L. Hofacker (NAR, 2008)) e o módulo de RNA Vienna para a calculadora de RBS. Os RBSs foram calculados em um servidor Linux rodando Python v.2.4.3.

MATERIAIS E MÉTODOS

[00385] O sítio de início traducional para PyddV é desconhecido, então sequências do construto Pyddv-IspA incluindo 40, 30 ou 20 nucleotídeos a montante da ORF de IspA e os primeiros 50 nucleotídeos da ORF foram analisados para a força de RBS prevista (vide **Tabela 12**).

TABELA 12: Pontuação prevista de RBS.

Nucleotídeos a montante	Pontuação de RBS
40	74,5145721603
30	51,9851812562
20	219,445238073

[00386] 75 foi escolhido como uma resistência alvo para o trabalho de design. Novos RBSs foram projetados usando a 5' UTR a montante do RBS (27 nucleotídeos, começando 40 nucleotídeos a montante da ORF) e 50 nucleotídeos da sequência da ORF. Múltiplos RBSs com uma determinada intensidade alvo foram calculados. RBSs de resistências direcionadas de 8, 25, 225, e 675 (1/9x, 1/3x, 3x, e 9x a pontuação do RBS endógeno de 75) foram projetados usando a sequência 5' UTR a montante tgattccgtctgatttcccagccttat (SEQ ID NO:74) e a sequência de ORF a jusante atggactttccgcaacaattggagggtgcgtaaagcaagcaaatcaagc (SEQ ID NO:75).

(II) RESULTADOS

[00387] Através de múltiplos ciclos de design computacional, dois a três RBSs foram projetados para cada pontuação alvo (vide **tabela 13**).

TABELA 13: RBSs projetados.

Nome	Pontuação alvo	RBS	Pontuação
PyddV-ispA_3A	3	ACTGTCAGGTCAACACTTACTTAA-GAAAC (SEQ ID NO:76)	3,123885295
PyddV-ispA_3B	3	TCGAGGGAGCCAAAAAAAACAAA-ACTTACTT (SEQ ID NO:77)	3,051627863
PyddV-ispA_8A	8	CGAACATAAAGCAGACGTCAG-CATTCGAAC (SEQ ID NO:78)	8,0960213
PyddV-ispA_8B	8	TACCGGATACGAACGGAAGCC-TATCGCAATT (SEQ ID NO:79)	7,267133647
PyddV-ispA_8C	8	GGACAATTCTACTACACT (SEQ ID NO:80)	8,638070397
PyddV-ispA_25A	25	TCTAGAGAAAGAGGGGAAACACTAG (SEQ ID NO:81)	23,12415389
PyddV-ispA_25B	25	TCTAGAGAAAGAGGGGAAATACTAT (SEQ ID NO:82)	24,18861806
PyddV-ispA_25C	25	TCTACGAGAAAAAGGGACTGACAA-GA (SEQ ID NO:83)	27,83505607
PyddV-ispA_225A	225	TCGAGAGATTAAACAGGCAGAAA-TACTAG (SEQ ID NO:84)	214,3693317
PyddV-ispA_225B	225	GTCGTAGAGATTTAGTAAGGAGC-CACTAT (SEQ ID NO:85)	240,1134974
PyddV-ispA_225C	225	ATCTGGAGATTAAAGCAGAGAAA-TACTAG (SEQ ID NO:86)	222,2280211
PyddV-ispA_675A	675	TCCAATAATTACAGCCAGGAGACA-GACTAT (SEQ ID NO:87)	716,1008352
PyddV-ispA_675B	675	TACAGAAATTAAAAGGAACAATAT-TAG (SEQ ID NO:88)	684,5875142
PyddV-ispA_675C	675	TGCTGAGGTTAAAGAGGAAAATAA-TAT (SEQ ID NO:89)	710,9629141

[00388] A análise da resistência de RBS prevista para estes RBSs no contexto de UTRs de diferentes comprimentos mostrou menos dependência de comprimento do que com RBS endógeno.

Exemplo 21: Clonagem/expressão de vários construtos da calcu-

ladora de RBS

[00389] O plasmídio pCMP1046 foi submetido a uma reação Quikchange de acordo com o protocolo do fabricante (Agilent, Santa Clara, CA, EUA) para se conseguir três RBSs alterados. Os iniciadores que foram usados são mencionados na **tabela 14**. Após digestão com DpnI, a reação foi transformada em células *E. coli* Top10 (Invitrogen, Carlsbdad, CA) e os transformantes foram selecionados em LB + 20 mg/L de canamicina. Os plasmídeos foram isolados de 6 colônias por reação e enviados para sequenciamento. Plasmídeos contendo os RBSs desejados foram chamados pCMP1249 (RBS 1/3), pCMP1258 (RBS 3) e pCMP1259 (RBS 9), respectivamente.

[00390] Os plasmídeos pCMP1249, 1258 e 1259 foram usados como moldes para reações de PCR usando os iniciadores CMP257 (5'-cattcgcgccgcattcacagccgattcgagccaccttcatcaccgcatagttgtcatcggttaacgctggaacac-3' (SEQ ID NO:90)) e CMP258 (5'-GGTTATTATTGAGCAGATGGGGCTG-CGCTTATTACTGTTGATTTCAATGACCTGTCGG CACTGAAGCAGG-3' (SEQ ID NO:91)). Os produtos de PCR foram purificados usando o kit de purificação de PCR Qiagen (Germantown, MD, EUA) e digeridos com a enzima de restrição DpnI. Após purificação adicional, os produtos de PCR foram usados em uma reação de recombinação (Datsenko e Wanner, *supra*) com a cepa CMP1133. Os transformantes foram selecionados em LB + 10 mg/L de canamicina. Uma colônia para cada transformação, que foi observada tendo o tamanho correto por PCR (usando os iniciadores CMP267 (5'-cgattcgagccaccttcatcacc-3' (SEQ ID NO: 92)) e CMP268 (5'-CAGCGTCTTCTGGTGCATGACG-3' (SEQ ID NO:93))) foi chamada de CMP1067. O marcador de canamicina foi espiralizado com pCP20 (Datsenko e Wanner, *supra*) para fazer CMP1262, CMP1266 e CMP1267, respectivamente (vide **tabela 15**). Para se obter a estrutura espiralizada, uma colônia transformada com

pCP20 (cultivada a 30 ℃ com 50 mg/L de carbenicili na) foi aplicada por estriamento em LB e cultivada a 42 ℃ de um dia para o outro. No dia seguinte, as colônias foram selecionadas e colocadas em LB e LB + 10 mg/L de canamicina. Uma colônia com o marcador espiralizado cresce em LB mas não em LB + 10 mg/L de canamicina. Os plasmí-deos pMCM1225 e pDW240 foram eletroporados em CMP1265, 1266 e 1267 concomitantemente. Para cada transformação, uma colônia que cresce em LB + 50 mg/L de carbenicilina e 50 mg/L de espectino-micina foi selecionada. Elas foram chamadas CMP1275, CMP1284 e CMP1286, respectivamente (vide **tabela 15**).

TABELA 14: Iniciadores usados para introduzir RBSs alterados no construto PyddV-lspA.

Nome do iniciador	Sequência iniciadora
QCPyddV-ispA1/3F	CtgatttcccagccttatTCTAGAG-AAGAGGGGAAACACTAGatggactttccgcaacaattg (SEQ ID NO:94)
QCPyddV-ispA1/3R	CAA TTG TTG CGG AAA GTC CAT CTA GTG TTT CCC CTC TTT CTC TAG AAT AAG GCT GGG AAA TCA G (SEQ ID NO:95)
QCPyddV-ispA3F	CtgatttcccagccttatATCTGGAGATTAAAGCAGAGAAATAC TAGatggactttccgcaacaattg (SEQ ID NO:96)
QCPyddV-ispA3R	CAA TTG TTG CGG AAA GTC CAT CTA GTA TTT CTC TGC TTT AAT CTC CAG ATA TAA GGC TGG GAA ATC AG (SEQ ID NO:97)
QCPyddV-ispA9F	CtgatttcccagccttatTACAGAAATTAAAAGGAACAATATTA Gatggactttccgcaacaattg (SEQ ID NO:98)
QCPyddV-ispA9R	CAA TTG TTG CGG AAA GTC CAT CTA ATA TTG TTC CTT TTA ATT TCT GTA ATA AGG CTG GGA AAT CAG (SEQ ID NO:99)

TABELA 15: Descrições das cepas.

Nome da cepa	Genótipo	Progenitor	Plasmídeos
CMP1262	BL21 t pgl, GI1.2gltA pgl-PL.2mKKDyI pgl yhfS-pKD4-PyddV(1/3rbs)ispA	CMP1133	Nenhum
CMP1266	BL21 t pgl, GI1.2gltA pgl-PL.2mKKDyI pgl yhfS-pKD4-PyddV(3rbs)ispA	CMP1133	Nenhum
CMP1267	BL21 t pgl, GI1.2gltA pgl-PL.2mKKDyI pgl yhfS-pKD4-PyddV(9rbs)ispA	CMP1133	Nenhum
CMP1275	BL21 t pgl, GI1.2gltA pgl-PL.2mKKDyI pgl yhfS-FRT-PyddV(1/3rbs)ispA, pCLPtr-cUppergallinarum, p-Trc(variante MEA) alba_mMVK	CMP1262	pMCM1225, pDW240
CMP1284	BL21 t pgl, GI1.2gltA pgl-PL.2mKKDyI pgl yhfS-FRT-PyddV(3rbs)ispA, pCLPtrcUp-pergallinarum, pTrc(variante MEA) alba_mMVK	CMP1266	pMCM1225, pDW240
CMP1286	BL21 t pgl, GI1.2gltA pgl-PL.2mKKDyIpgl yhfS-FRT-PyddV(9rbs)ispA, pCLPtrcUp-pergallinarum, pTrc(variante MEA) alba_mMVK	CMP1267	pMCM1225, pDW240

Exemplo 22: Análise de expressão de farnesil difosfato sintase (IspA)

[00391] Um método ELISA sanduíche foi desenvolvido para quantificar os níveis de expressão de farnesil difosfato sintase (IspA) em um lisado celular de *E. coli*. Usando este método, a concentração de IspA foi analisada para as cepas descritas na **tabela 16**.

TABELA 16: Descrições das cepas.

Não	n° da cepa	n° da fermentação	Genótipo
1	BL21	20120607	Cepa selvagem
2	CMP1286	20120571	BL21 t pgl, GI1.2gltA pgl-PL.2mKKDylpgl yhfS-FRT-PyddV(9rbs)ispA-go, pCLPtrcUppergallinarum, transformação dupla de p-Trc(variante MEA) alba mMVK
3	CMP1284	20120572	BL21 t pgl, GI1.2gltA pgl- PL.2mKKDyl pgl yhfS-FRT-PyddV(3rbs)ispA-go, p-CLPtrcUppergallinarum, transformação dupla de pTrc(variante MEA) alba mMVK
4	DW719	20120565	BL21 t pgl, GI1.2gltA pgl- PL.2mKKDyl BL21 t pgl, GI1.2gltA pgl- PL.2mKKDyl pgl-, E. gallinarum superior (pMCM1225), Ptrc-P. alba lspS (variante MEA)mMVK (pDW240)
5	CMP1275	20120566	BL21 t pgl, GI1.2gltA pgl- PL.2mKKDyl pgl yhfS-FRT-PyddV(1/3rbs)ispA col2, pCLPtrcUppergallinarum, pTrc(variante MEA) alba mMVK

MATERIAIS E MÉTODOS

[00392] A enzima His-IspA foi purificada no laboratório. O anticorpo anti-IspA purificado por afinidade e o anticorpo anti-IspA biotinilado foram preparados pela ProSci Incorporated. Estreptavidina-HRP de alta sensibilidade, substrato quimioluminescente SuperSignal ELISA Pico, placas de 96 poços pretas costar 3915, vedações de placa de ELISA, e PBS 10X foram comprados junto à Thermo Scientific. Cloridrato de 4-(2-aminoetil) benzenossulfonil fluoreto (AEBSF), desoxirribonuclease 1 de pâncreas bovino, NaCl, imidazol, HEPES, NaH_2PO_4, EDTA, DTT, Tween-20, albumina sérica bovina (BSA) e 200 mM isopropil-beta-D-tiogalactosídeo (IPTG) foram comprados junto à Sigma. As colunas Trap IMAC HP e colunas de dessalinização Prep 26/10 foram compradas junto à HP. O tampão de lavagem

da placa de ELISA (PBS-T) consistiu em PBS 1X com Tween-20 a 0,05%. O tampão de bloqueio foi feito de 5% de BSA em PBS-T. O tampão de lavagem da coluna de níquel em pH 8 continha 50 mM de NaH_2PO_4 e 300 mM de NaCl. O tampão de eluição da coluna de níquel em pH 8 consistiu em imidazol 20 mM, NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM e imidazol 500 mM. A prensa francesa foi comprada junto à American Instrument Company.

[00393] **Purificação de IspA**: Uma cultura de um dia para o outro de MD08_67 (ispA-D227D-pET200D em BL21 (DE3)) foi cultivada em meio LB a 30 ℃. A cultura do dia foi iniciada em meio LB fresco pela adição de 10 mL de inóculo de um dia para o outro a 1 L de meio LB fresco a 34 ℃. As células foram induzidas com 200 µM de IPTG e coletadas 4 h após a indução. O pélete de células foi ressuspenso em tampão de lavagem de níquel com 1 mg/mL de lisozima, 0,1 mg/mL de DNase e 0,5 mM de AEBSF. A suspensão de células foi lisada usando uma célula de prensa francesa a 96,5 MPa (14.000 psi). O sobrenadante do lisado foi passado através de uma coluna de níquel e eluído usando tampão de eluição de níquel. As frações enzimáticas purificadas foram dessalinizadas com 1X PBS para purificação de afinidade adicional e preparações de anticorpo marcado. A concentração da enzima purificada foi determinada por UV a 280 nm.

[00394] **Método de lise celular para análise de expressão de IspA**: Para a análise de expressão de IspA, péletes da célula de amostra de fermentação foram ressuspensos em 2 mL de 1X PBS com 0,1% DNase e AEBSF 0,5 mM. A suspensão de células foi lisada usando uma célula de prensa francesa a 96,5 MPa (14.000 psi). O lisado foi, então, centrifugado a 15.000 rpm durante 10 min a 4 ℃ em uma centrífuga Eppendorf 5804R. O sobrenadante e o pélete foram separados, e o sobrenadante foi usado para quantificar o nível de expressão de IspA.

[00395] **Método de ELISA sanduíche**: Uma placa de 96 poços preta foi revestida com 5 µg/mL de anticorpo de captura a 4 ℃ de um dia para o outro. Após ~24 h, a placa foi lavada 3 vezes com PBS-T e bloqueada com 5% de BSA em PBS-T durante 2 h a 37 ℃. Após a lavagem 3 vezes com PBS-T, a placa foi revestida com 100 µL de uma amostra desconhecida em PBS por 1 h a 37 ℃, 2 µg/m L de anticorpo anti-IspA biotinilado em PBS-T durante 1 h a 34 ℃, e 1 µg/mL de conjugado de estreptavidina-HRP em PBS durante 1 h a 34 ℃. A placa foi lavada 3 vezes com PBS-T antes de cada revestimento. Subsequentemente, 100 µL de substrato luminescente foram adicionados e a densidade óptica final foi determinada a 425 nm. O IspA purificado foi usado para gerar uma curva padrão para calcular a concentração de IspA nas amostras (vide **tabela 17** e **Figura 27**).

TABELA 17: Concentração de IspA nas cepas definidas.

	Expressão de IspA nas amostras de fermentação, pg/L/OD				
	BL21	**DW719**	**CMP1275**	**CMP1284**	**CMP1286**
EPT, horas	**BL21-selvagem**	**PyddV ispA**	**PyddV(I/3rbs) ispA**	**PyddV(3rbs) ispA**	**PyddV(9rbs) ispA**
12	74,94	1,11	0,84	1,06	3,04
24	10,34	0,15	0,27	0,16	0,62
36	7,13	0,15	0,26	0,78	0,78
48	10,25	0,24	0,36	0,32	0,46

RESULTADOS

[00396] Conforme mostrado na tabela 17, cada uma das cepas de *E. coli* manipuladas para ter um nível diminuído de expressão de ispA apresentaram níveis de expressão de ispA significativamente menores em comparação à cepa de controle (BL21) que possuía ispA selvagem.

Exemplo 23: Resultados da fermentação em grande escala

[00397] Este experimento foi feito para avaliar a produção de isopreno a partir de vários hospedeiros de *E. coli* (BL21) modificados

(CMP1275, CMP1284, CMP1286) expressando genes introduzidos da rota do mevalonato/isopreno e cultivados em cultura de batelada alimentada na escala de 15 L. As modificações de hospedeiro introduzidas nestas cepas foram no promotor yddV em frente ao IspA (vide **tabela 18**), e as modificações foram projetadas de acordo com uma calculadora de RBS na esperança de modificar a resistência do promotor e, portanto, o nível de expressão de IspA. Estas cepas produtoras de isopreno foram testadas em um processo de produção padrão, conforme descrito a seguir. As métricas de desempenho de uma cepa de controle (DW719) são comparadas aqui às cepas experimentais CMP1275 (RBS1/3), CMP1284 (RBS3) e CMP1286 (RBS9). O objetivo destes experimentos é determinar se a expressão de IspA pode ser modificada de modo a permitir um excedente mínimo dos intermediários potencialmente tóxicos FPP e GPP de modo a aumentar a viabilidade celular ao máximo, e aumentar o rendimento de isopreno em relação à glicose ou a produtividade do isopreno. As cepas "RBS ladder" experimentais foram testadas sob as mesmas condições que o controle (DW719) para determinar se qualquer aprimoramento no rendimento ou produtividade poderia ser atribuído à expressão modificada de IspA. O modelo começa com uma resistência de ligação ao ribossomo (RBS) de 1 e diferentes sequências de RBS deram valores almejando resistência de ligação ao ribossomo previstas de 1/3 (redução de 3 vezes), 3 (aprimoramento de 3 vezes) e 9 (aprimoramento de 9 vezes). Entretanto, os níveis de expressão reais de IspA não foram medidos neste experimento.

TABELA 18: Lista de cepas.

Nome da cepa	Modificação do hospedeiro / promotor de yddV	Plasmídeo superior	Plasmídeo inferior	Números de testes
DW719 (controle)	BL21 t pgl, GI1.2gltA pgl-PL.2mKKDyI t pgl, GI1.2gltA pgl-PL.2mKKDyI pgl-(promotor de yddV)	Ptrc-P. alba IspS (variante MEA)-mMVK, Carb50 ppm (pDW240)	E. gallinarum superior, Spec50 ppm (pMCM1225)	20120526 20120565
CMP1275	BL21 t pgl, GI1.2gltA pgl-PL.2mKKDyI t pgl, GI1.2gltA pgl-PL.2mKKDyI pgl yhfS-FRT-PyddV(1/3rbs)ispA col2	pDW240	pMCM1225	20120566
CMP1284	BL21 t pgl, GI1.2gltA pgl-PL.2mKKDyI t pgl, GI1.2gltA pgl-PL.2mKKDyI pgl yhfS-FRT-PyddV(3rbs)ispA-go	pDW240	pMCM1225	20120572
CMP1286	BL21 t pgl, GI1.2gltA pgl-PL.2mKKDyI t pgl, GI1.2gltA pgl-PL.2mKKDyI pgl yhfS-FRT-PyddV(9rbs)ispA-go	pDW240	pMCM1225	20120571

[00398] Neste experimento, DW719 (promotor de YddV-IspA) foi usada como a cepa de linha de base. Observe que experimentos iniciais sob condições típicas de pequena escala usando REM B7_26 (CMP1199 (HMB GI1.2gltA pgl-) + pDW240 + pMCM1225) contendo uma cepa de IspA selvagem, foram feitos para determinar a capacidade daquela cepa de produzir isopreno em comparação a DW719. DW719 mostrou melhor crescimento e produtividade específica (18.276 µg/L/h/OD de isopreno) em comparação a REM B7_26 (a produtividade específica foi 10.184 µg/L/h/OD de isopreno). Desta forma, a produtividade específica da cepa DW719 foi quase 2 vezes maior que a da cepa selvagem. Com base na produção de isopreno de REM B7_26 em pequena escala, fermentações de 15 L não foram feitas

nesta cepa.

MATERIAIS E MÉTODOS

[00399] **Receita do meio** (por litro do meio de fermentação): 7,5 g de K2HPO4, 2 g de MgSO4 * 7H2O, 2 g de mono-hidrato de ácido cítrico, 0,3 g de citrato férrico de amônio, 0,5 g de extrato de levedura, 1,6 mL de ácido sulfúrico a 50%, 1 ml de solução de metais-traço modificada a 1.000X. Todos os componentes foram adicionados em conjunto e dissolvidos em água desionizada. Esta solução foi esterilizada por calor (123 ℃ durante 20 min). O pH foi ajustado para 7,0 com hidróxido de amônio (28%) e levado ao volume. 10 g de Glicose, 8 mL de Solução de Vitamina, e antibióticos foram adicionados após a esterilização e o ajuste de pH.

[00400] **Solução de metais-traço modificada a 1.000X** (por litro): Ácidos cítricos * H2O 40 g, MnSO4 * H2O 30 g, NaCl 10 g, FeSO4 * 7H2O 1 g, CoCl2 * 6H2O 1 g, ZnSO * 7H2O 1 g, CuSO4 * 5H2O 100 mg, H3BO3 100 mg, NaMoO4 * 2H2O 100 mg. Cada componente foi dissolvido um por vez em água desionizada, o pH foi ajustado em 3,0 com HCl/NaOH, e, então, a solução foi levada ao volume e esterilizada por filtro com um filtro de 0,22 mícron.

[00401] **Solução de vitamina** (por litro): 1,0 g de cloridrato de tiamina, 1,0 g de D-(+)-biotina, 1,0 g de ácido nicotínico, 4,0 g de cloridrato de piridoxina. Cada componente foi dissolvido um por vez em água desionizada, o pH foi ajustado em 3,0 com HCl/NaOH, e, então, a solução foi levada ao volume e esterilizada por filtro com filtro de 0,22 mícron.

[00402] **Solução salina macro** (por litro): 296 g de MgSO4 * 7H2O, 296 g de monoidrato de ácido cítrico, 49,6 g de citrato férrico de amônio. Todos os componentes foram dissolvidos em água, q.s. para o volume e esterilizados por filtração com filtro de 0,22 mícron.

[00403] **Solução de alimentação** (por quilograma): 0,590 kg de gli-

cose, 0,393 kg de H2O desionizada, 7,4 g de K2HPO4, e 8,9 g de Foamblast882 100%. Todos os componentes foram misturados juntos e autoclavados. Após autoclavagem da solução de alimentação, os suplementos de nutrientes são adicionados ao tubo de alimentação em uma capela estéril. As adições pós-esterilização à alimentação são (por quilograma de solução de alimentação), 5,54 ml de solução salina macro, 6,55 ml de solução de vitaminas, 0,82 ml de solução de metais-traço modificada a 1.000X, 10 mg/mL de solução de IPTG (1,86 mL).

[00404] Esse experimento foi executado para monitorar a produção de isopreno a partir de glicose no pH (7,0) e na temperatura de fermentação (34 ℃) desejada. Para começar cada experi mento, o frasco congelado adequado da cepa de *E. coli* (BL21) foi descongelado e inoculado em um frasco com meio de extrato de levedura triptona (LB) e os antibióticos adequados. Depois que inóculo cresceu para uma densidade óptica de aproximadamente 1,0, conforme medido a 550 nm (OD_{550}), 500 ml foram usados para inocular um biorreator de 15 L e levar o volume do inicial do tanque para 5 L.

[00405] O gás de entrada usado para manter a pressão contrária do biorreator na medida de 70 kPa (0,7 bar) e para fornecer o oxigênio aos organismos de produção foi suprido por instalações locais que diluem o gás de entrada para uma concentração conhecida (7,7 a 9,5 % em volume de oxigênio).

[00406] Os meios de batelada tinham glicose em batelada a 9,7 g/L. A indução foi realizada pela adição de IPTG. Uma dose de IPTG foi adicionada ao tanque para levar a concentração para um nível especificad quando as células estavam em uma OD_{550} de 6. Uma vez que a glicose foi consumida pela cultura, como assinalado por uma elevação no pH, a solução de alimentação de glicose foi alimentada para atender as demandas metabólicas em taxas menores que ou iguais a 10 g/min. A fermentação foi executada por tempo suficiente para determi-

nar o rendimento máximo cumulativo em massa de isopreno relativo à glicose, um total de 56 a 64 h de tempo decorrido de fermentação. A única variável no processo foi a cepa usada para começar o frasco.

[00407] Os níveis de oxigênio, nitrogênio, e dióxido de carbono no efluente gasoso foram determinados independentemente usando os espectrômetros de massa iSCAN (Hamilton Sundstrand) e Hiden HPR20 (Hiden Analytical). O oxigênio dissolvido no caldo de fermentação foi medido por uma sonda sanitária esterilizável com um sensor óptico fornecido pela Hamilton Company.

[00408] As concentrações de citrato, glicose, acetato, e mevalonato no caldo de fermentação foram determinadas em amostras de caldo tomadas a intervalos de 4 horas por análise de HPLC. As concentrações nas amostras de caldo foram determinadas por comparação da resposta do índice de refração em função de uma curva de calibração previamente gerada usando um padrão de uma concentração conhecida. As informações relevantes sobre o HPLC são as seguintes: a) sistema: Waters Alliance 2695; b) coluna: coluna de exclusão de íons BioRad - Aminex HPX-87H, 300 mm x 7,8 mm, n° de catálogo 125-0140; c) temperatura da coluna: 50 ℃; d) coluna de guarda: Refil de cátions de H BioRad - Microguard, 30 mm x 4,6 mm, n° de catálogo 125-0129; e) tampão de corrida: H_2SO_4 0,01 N; f) vazão do tampão de corrida: 0,6 mL/min; g) pressão de corrida aproximada: 7584-8274 MPa (1.100 - 1.200 psi); h) volume de injeção: 20 µL; i) detector: Índice de refração (Knauer K-2301); e j) tempo de funcionamento: 26 min.

(II) RESULTADOS

[00409] As métricas de produtividade de isopreno são resumidas na **tabela 19**. No todo, o desempenho da cepa com os sítios RBS modificados foi similar ao da cepa de controle (DW719, teste 20120526 e 20120565). As cepas com os sítios RBS modificados alcançaram um % de rendimento cumulativo de isopreno em relação à glicose que

foi similar ao da cepa de controle (DW719, testes 20120526 e 20120565) (vide **Figura 28**). As cepas com os sítios RBS modificados alcançaram rendimentos instantâneos de pico de isopreno similares em relação à glicose que foram similares aos da cepa de controle (DW719, runs 20120526 and 20120565) (vide **FIG. 29**). As cepas modificadas obtiveram maiores valores de rendimento instantâneo precocemente no teste e a cepa CMP1284 teve o desempenho mais robusto no final do teste (56 a 64 h EFT) bem como os menores níveis de FPP. As cepas com os sítios RBS modificados alcançaram uma produtividade volumétrica de isopreno que foi similar a da cepa de controle (DW719, testes 20120526 e 20120565) (vide **Figura 30**). As cepas com os sítios RBS modificados alcançaram uma CPI de isopreno que foi similar a da cepa de controle (DW719, testes 20120526 e 20120565) (vide **Figura 31**). Entretanto, após 40 h de tempo de fermentação, a cepa CMP1286 (RBS9) mostrou crescimento celular continuado e rendimento instantâneo de isopreno inferior em relação à glicose. Pode ser que a expressão aumentada de IspA tenha permitido maior fluxo para os precursores de isoprenoide, permitindo assim mais crescimento. Poderia ser que este nível de expressão de IspA representasse uma extremidade de topo ao nível de expressão desejável. Em contrapartida, a cepa 1/3RBS tinha a menor massa celular total e o maior CPI no final do teste. Isto pode representar uma baixa extremidade para o nível de expressão de IspA desejável já que ela também tinha a menor produtividade volumétrica das 3 cepas "RBS ladder" examinadas. As cepas com os sítios RBS modificados alcançaram uma produtividade específica de isopreno que foi similar a da cepa de controle (DW719, testes 20120526 e 20120565) (vide **Figura 32**).

TABELA 19. Métricas de produtividade de isopreno

Nome da cepa / Número do teste/ (RBS)	Conc. de oxigênio de entrada (%, em volume)	Total máximo % de rendimento de isopreno em relação à glicose (g/g%)	% de rendimento instantâneo de pico de isopreno em relação à glicose (g/g%)	Produtividade volumétrica de isopreno Total (g/L/h) no momento do rendimento de isopreno total máximo	CPI (g isopreno/ gDCW) no tempo de máximo rendimento total de isopreno	Produtividade específica de pico (mg isopreno/ L/h/OD)
DW719 / 20120526	8,61	17,84	20,41 (+/- 0,91)	2,45	2,48	38,01
DW719 / 20120565	8,85	16,53	19,22 (+/- 0,38)	2,03	2,27	33,48
CM1275 / 20120566 / (RBS 1/3)	8,86	17,12	19,28 (+/- 0,85)	2,22	2,54	41,21
CMP1284 / 20120572 / (RBS3)	8,71	17,49	19,37 (+/- 1,28)	2,41	2,45	36,97
CMP1286 / 20120571 / (RBS9)	8,73	17,32	19,71 (+/- 0,99)	2,35	1,97	38,01
CMP1043 Cepa de controle	-	14,26	-	1,69	1,64	26,87 (a 16 h EFT)

Exemplo 24: Análise de metabólitos para variantes de IspA

[00410] Estes exemplos mediram os metabólitos das variantes de expressão de IspA em *E. coli.*

MATERIAIS E MÉTODOS

[00411] **Extração de metabólitos de *E. coli*.** O metabolismo de células bacterianas cultivadas em fermentadores foi rapidamente inativado pela retirada de aproximadamente 3 mL de cultura para um tubo cheio com 9 mL de metanol gelado seco. As amostras resultantes foram pesadas para calcular a quantidade de caldo de amostragem e, em seguida, armazenadas a -80 ℃ até análiseposteri or. Para a extração e concentração de metabólitos, alíquotas de 0,25 mL de suspensão de células (0,4 mL foi usado caso a densidade celular da cultura medida em OD_{600} estivesse abaixo de 50) foram diluídas com 1,5 mL de mistura de metanol/tampão de acetato de amônio (5 mM, pH=8,0) (6:1, v/v) e os restos de células foram peletizados por centrifugação por 4 minutos. O sobrenadante foi coletado e carregado em colunas Strata-X-AW da Phenomenex (33 µm de 30 mg/poço, troca aniônica fraca polimérica de 96 poços). O pélete de células foi extraído mais duas vezes, primeiro com 1,5 mL da mistura de metanol/tampão de acetato de amônio (5 mM, pH=8,0) (6:1 v/v), e, em seguida, com 1,5 mL de mistura de metanol/tampão de acetato de amônio (5 mM, pH=8,0) (1:1 v/v). Nas duas vezes as células foram peletizadas por centrifugação, e os sobrenadantes resultantes foram consecutivamente carregados nas mesmas colunas Strata-X-AW. Durante a extração-centrifugação, as amostras com as células foram mantidas abaixo de 4 ℃. Após a lavagem das colunas com 1 mL de água e 1 mL de metanol, os metabólitos de interesse foram eluídos das colunas primeiramente com 0,3 mL de uma mistura concentrada de NH_4OH/metanol (1:14, v/v) e, então, com 0,3 mL de uma mistura concentrada de NH_4OH/metanol/água (1:12:2, v/v/v). O eluente resultante foi neutrali-

zado pela adição de 20 µL de ácido acético glacial e, em seguida, clarificado por centrifugação.

[00412] **Quantificação de metabólito**. A análise dos metabólitos foi realizada por espectrometria de massa com o uso de um sistema TSQ Quantum Access (Thermo Scientific). Todo o controle do sistema, aquisição de dados e avaliação de dados espectrais de massa foram realizados com o uso do software XCalibur e LCQuan (Thermo Scientific). Para o método LC-ESI-MS/MS, uma coluna de HPLC quiral de 5 µM Nucleodex β-OH (100×2 mm, Macherey-Nagel, Alemanha) foi usada com um cartucho de guarda de CC 8/4 Nucleodex beta-OH. Um gradiente de fase móvel foi aplicado como descrito na **Tabela 20** em que a fase móvel A foi de tampão de bicarbonato de amônio 100 mM (grau BioUltra, Fluka, pH 7) em água grau MilliQ, a fase móvel B foi água grau MilliQ, e a fase móvel C foi acetonitrila (Honeywell B&J Brand, grau LC-MS). As temperaturas da coluna e da bandeja da amostra foram reduzidas para 5 ℃ e 4 ℃, respectiva mente. O volume de injeção foi 10 µL.

TABELA 20. Gradiente de HPLC usado para eluir metabólitos na rota de MVA.

Tempo	Solvente A	Solvente B	Solvente C	Vazão
0,0 min	20 %	0%	80 %	0,4 mL/min
0,5 min	20%	0%	80%	0,4 mL/min
5,5 min	60%	0%	40%	0,4 mL/min
6,5 min	60%	0%	40%	0,4 mL/min
7,0 min	0,5%	59,5%	40%	0,5 mL/min
13,0 min	0,1%	34,9%	65%	0,5 mL/min
13,5 min	20%	0%	80%	0,5 mL/min
14,5 min	20%	0%	80%	0,5 mL/min

[00413] A detecção de massa foi realizada com o uso de ionização por eletrospray no modo negativo (tensão de aspersão de ESI de 3,5 kV e a temperatura do tubo de transferência de íons de 350 ℃). Os

seguintes valores de m/z para íons precursores foram selecionados para detectar os metabólitos de interesse no modo SRM: 245,1 para IPP e DMAPP, 313,1 para GPP, 381,0 para FPP, 227,1 para MVP, e 307,1 para MVPP. Para compensar pequenas variações na sensibilidade durante a utilização do espectrômetro de massa, $^{13}C_{10}$-ADP uniformemente marcado foi também adicionado em quantidades iguais (concentração final de 19,6 µM) a ambas as amostras e calibradores como um padrão interno ($^{13}C_{10}$-ADP foi preparado enzimaticamente a partir de $^{13}C_{10}$-ATP obtido junto à Isotec, Sigma-Aldrich; m/z = 436,1). As concentrações de metabólitos foram determinadas com base na razão de resposta de amostra/padrão interno das intensidades integradas dos picos gerados pelo produto de íon PO_3^- (m/z =79,0), ou no caso de ADP marcado, o íon do produto difosfato (m/z = 159,0). As curvas de calibração obtidas pela injeção de padrões foram usadas para calcular as concentrações de metabólitos nos extratos celulares. Os padrões de IPP, DMAPP, GPP, e FPP foram adquiridos junto à Echelon Biosciences Inc., e MVP e MVPP foram adquiridos junto à Sigma-Aldrich.

(II) RESULTADOS

[00414] As concentrações de IPP, DMAPP, GPP, e FPP após 32 e 44 h de fermentação são apresentadas nas **tabelas 21** e **22**, e nas **Figuras 33 a 36**.

TABELA 21. Concentrações de FPP, GPP, DMAPP, e IPP após 32 h de fermentação.

32 h	FPP (mM)	GPP (mM)	DMAPP (mM)	IPP (mM)
CMP1275	0,030	0,066	7,346	14,038
CMP1284	0,007	0,032	3,180	4,899
CMP1286	0,039	0,065	2,995	6,423
DW719	0,054	0,119	6,844	9,736
REM H9_25	1,622	0,257	2,635	5,534
CMP1136	0,093	0,124	12,792	9,696

TABELA 22. Concentrações de FPP, GPP, DMAPP, e IPP após 44 h de fermentação.

44 h	FPP (mM)	GPP (mM)	DMAPP (mM)	IPP (mM)
CMP1275	0,020	0,028	4,801	19,732
CMP1284	0,008	0,024	1,903	5,236
CMP1286	0,020	0,030	2,112	9,830
DW719	0,042	0,067	5,334	15,749
REM H9_25	2,091	0,224	1,724	4,313
CMP1136	0,090	0,089	4,202	6,656

Exemplo 25: Isopreno sintase constitutiva na cepa hospedeira de IspA re-estruturada

[00415] Isopreno sintase, IspS e IspS_mMVK, foram expressos constitutivamente sem o repressor *lacIq*.

MATERIAIS E MÉTODOS

[00416] **Construção de pCH**L426**, pTrc**(**lacI deletado**)**_pTrc-IspS**(**variante**)**_ mMVK**. O gene repressor *lacIq* foi deletado do plasmídio pDW240 com o uso dos seguintes iniciadores: CL449F (5'-attcagggtgtgagcgcaacgcaattaatgt-3' (SEQ ID NO:100)) e CL450R (5'-GTTGCGCTCACACCCTGAATTGACTCTCTTC-3' (SEQ ID NO:101)). A reação de PCR consistiu em um DNA molde, pDW240 (100 ng), 50 µM de cada iniciador de sentido direto (CL449F) e iniciador de sentido reverso (CL450R), 1 µL de dNTPs 10 mM (Roche), 5 µl de tampão de reação pfuII 10X (Agilent), 1 µL de enzima de fusão pfu II (Agilent), e 40 µL de água. Dezoito ciclos foram realizados com um perfil de temperatura de 50 segundos a 95 ℃, e 50 segundos a 60 ℃, e 4 minutos a 68 ℃ e um adicional de 10 minutos de extensão a 68 ℃ em um termociclador Bio-Rad. Após o término da reação de PCR, 1 µL de DpnI foi adicionado e a mistura foi incubada a 37 ℃ dur ante 2 h para remover o DNA molde. Um adicional de 1 µL de DpnI foi adicionado e a mistura foi incubada a 37 ℃ de um dia para o outro . A seguir, 2 µL da

reação foram transformados em células TOP10F' (Invitrogen) e plaqueados em LA + carbenicilina 50 mg/L. Em modalidades alternativas, 2 µL da reação podem ser transformados em células TOP10F' (Invitrogen) e plaqueados em LB + 50 mg/L de carbenicilina. O clone correto foi confirmado por sequenciamento. O mapa plasmidial e a sequência do plasmídeo são mostrados nas **Figuras 37** e **38**.

[00417] **Construção de pCHL427, pTrc(lacI deletado)_pTrc-IspS(variante)**. O gene repressor *laclq* foi deletado do plasmídio pMCM2149 com o uso dos seguintes iniciadores: CL449F (5'-attcagggtgtgagcgcaacgcaattaatgt-3' (SEQ ID NO:102)) e CL450R (5'-GTTGCGCTCACACCCTGAATTGACTCTCTTC-3' (SEQ ID NO:103)). A reação de PCR consistiu em DNA molde, pMCM2149 (100 ng), 50 µM de cada iniciador de sentido direto (CL449F) e iniciador de sentido reverso (CL450R), 1 µL de dNTPs 10 mM (Roche), 5 µL de tampão de reação pfuII 10X (Agilent), 1 µL de enzima de fusão pfu II (Agilent), e 40 µL de água. Dezoito ciclos foram realizados com um perfil de temperatura de 50 segundos a 95 ℃, e 50 segundos a 60 ℃, e 4 minutos a 68 ℃ e um adicional de 10 minutos de extensão a 68 ℃ em um termociclador Bio-Rad. Após o término da reação de PCR, 1 µL de DpnI foi adicionado e a mistura de reação foi incubada a 37 ℃ durante duas horas para remover o DNA molde. Um adicional de 1 µL de DpnI foi adicionado e a mistura foi incubada a 37 ℃ de um d ia para o outro. A seguir, 2 µL da reação foram transformados na célula TOP10F' (Invitrogen) e plaqueados em LA + 50 mg/L de carbenicilina. Em modalidades alternativas, 2 µL da reação podem ser transformados em células TOP10F' (Invitrogen) e plaqueados em LB + 50 mg/L de carbenicilina. O clone correto foi confirmado por sequenciamento. O mapa plasmidial e a sequência do plasmídeo são mostrados nas **Figuras 39** e **40**.

[00418] **Construção de uma cepa para produção de isopreno constitutiva**. pCHL426 e pCHL427 foram transformados por eletropo-

ração nas cepas mencionadas na **tabela 23**. Vários RBSs com hospedeiros com nível de expressão de IspA diferencial foram capazes de acomodar variantes de IspS expressas constitutivamente. Em particular, as variantes de isopreno sintase expressas constitutivamente expressas no antecedente de hospedeiro de CMP1281 mostraram crescimento celular e produtividade específica de isopreno similar ou melhor do que as cepas de controle de IPTG (**Figuras 41** e **42**).

TABELA 23. Cepas usadas para transformação.

CMP1133	HMB GI1.2gltA yhfSFRTPyddVIspAyhfS thiFRTtruncIspA pgl ML
CMP1279	BL21 t pgl, GI1.2gltA pgl- PL.2mKKDyI pgl yhfS-FRT-PyddV(1/3rbs)ispA-go
CMP1280	BL21 t pgl, GI1.2gltA pgl- PL.2mKKDyI pgl yhfS-FRT-PyddV(3rbs)ispA-go
CMP1281	BL21 t pgl, GI1.2gltA pgl- PL.2mKKDyI pgl yhfS-FRT-PyddV(9rbs)ispA-go

Exemplo 26: Construção de uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae* contendo o gene que codifica farnesil pirofosfato sintetase (ERG20)

A. Inserção de ERG20P ou um promotor alternativo, e ERG20 em um lócus diferente

[00419] Protocolos de reação em cadeia de polimerase (PCR) em colônia são feitos de acordo com o seguinte método. O molde é DNA cromossômico de uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae*. O molde é usado na seguinte reação de PCR: 100 ng de DNA molde em 1 µl, 10 µl de tampão Herculase, 1 µl de dNTPs a 100 mM, 1,25 µl de iniciador de sentido direto a 10 mM, 1,25 µl de iniciador de sentido reverso a 10 mM, 1 µl de DNA polimerase Herculase Fusion II (Agilent Technologies, Stratagene Products Division, La Jolla, Califórnia, EUA), e 34,5 µl de H2O desionizada. A reação de PCR é ciclada em um termociclador PCR Express (Thermo Hybaid, Franklin, MA, EUA) conforme exposto a

seguir: 95℃/2 minutos; 30 ciclos de 95℃/20 segund os, x℃ (temperatura de anelamento)/20 segundos, e 72℃/(40 segundo s/kb de produto). A reação é resfriada para 4℃. A temperatura d e anelamento de x℃ é escolhida para ser 3℃ menor que a menor temp eratura de fusão do par de iniciadores. O tamanho do fragmento de PCR resultante é determinado em um E-gel® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) prémoldado a 0,8%, com o uso do marcador de peso molecular DNA Molecular Weight Marker X (75 a 12.216 bp) (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha) como marcador de tamanho.

[00420] Para a inserção de ERG20 em um lócus exógeno (por exemplo, PDC6), três pedaços de DNA são gerados por PCR. O pedaço 1 contém uma sequência de 15 bp que permite união pelo kit sem emendas (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) a um vetor pBBR1MCS5 digerido com XbaI/EcoRI (Kovach *et al.* 1995. *Gene* 166:175-176), uma região (em torno de 50 bp) homóloga à região PDC6 de *Saccharomyces cerevisiae*, um marcador de URA3 e seu promotor flanqueado por sítios loxP, e 15 bp que permitem união ao promotor de ERG20 ou qualquer outro promotor escolhido (outros promotores podem ser escolhidos com base em sua assinatura de expressão, como determinado por experimentos de microarranjo de uma cepa de *S. cerevisiae* que produz isopreno). O objetivo dos outros promotores escolhidos é pegar um promotor que fornece menor expressão da enzima ispA do que o promotor ERG20 endógeno o tempo todo ou, alternativamente, durante o período de produção de um teste de fermentação (ou quando moléculas de isoprenoide começam a se acumular). O molde é um plasmídio contendo o gene URA3 entre os sítios loxP. O pedaço 2 contém o promotor do gene ERG20 ou um dos outros promotores escolhidos. O molde para este pedaço é DNA cromossômico de uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae*. Iniciadores são projetados para permitir união sem emendas ao pedaço 1 e ao

pedaço 3. O pedaço 3 contém o gene ERG20 de *S. cerevisiae* amplificado a partir de DNA cromossômico ou um alelo com códons redesenhados, uma região de homologia para recombinação no lócus de PDC6 (em torno de 50 bp, incorporada no iniciador) e dois conjuntos de 15 bp que permitem união com o pedaço 2 e pBBR1MCS5 digerido por XbaI e EcoRI. O molde para este pedaço é DNA cromossômico de *Saccharomyces cerevisiae*, ou um plasmídio contendo uma versão com alteração de códons do gene, projetada e sintetizada por DNA2.0 (Menlo Park, CA).

[00421] Todas as reações em cadeia da polimerase (PCR) são feitas usando Herculase II Fusion de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante (Agilent Technologies, Stratagene Products Division, La Jolla, Califórnia, EUA). Os produtos de reação são purificados usando o kit de purificação de PCR da Qiagen (Germantown, MD, EUA). Os pedaços 1, 2 e 3 são então unidos com o plasmídeo pBBR1-MCS5 digerido por EcoRI/XbaI usando o kit de clonagem e união sem emendas GeneArt (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. A reação é transformada em células *E. coli* Top10 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), e os transformantes são selecionados em LB + 5 mg/L de gentamicina. O plasmídeo é isolado de uma destas colônias, e designado pCPN100 para o promotor de ERG20, e pCPN110, 120, 130 para os três promotores alternativos. A presença do construto da direita no plasmídeo é confirmada por sequenciamento (Quintara Bio, Albany, CA, EUA). Os plasmídeos pCPN101, pCNP100, 110, 120 e 130 são usados como um molde para uma reação de PCR usando iniciadores que amplificam o cassete construído inteiro. Os produtos de PCR são purificados usando o kit de purificação de PCR da Qiagen (Germantown, MD, EUA). Após purificação adicional, este produto de PCR é transformado em URA3, HIS3 menos versão de S. cerevisiae usando o kit de trans-

formação de levedura Sigma de acordo com o protocolo do fabricante (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo, EUA). Os transformantes são selecionados em Nitrogênio Levedura Base sem aminoácidos (Difco Yeast Nitrogen Base without Amino Acids) suplementado com Formedium Drop-Out (Kaiser, DSCK162), histidina e 10 g/L de glicose ou etanol. Após re-estriar uma colônia mais uma vez nas mesmas placas, a presença do inserto da direita é verificado por PCR usando DNA cromossômico de uma colônia que cresce nestas placas. O marcador URA3 é espiralizado com um plasmídeo que expressa uma recombinase Cre induzível e um gene HIS3, que é introduzido por transformação (kit de transformação de levedura Sigma) e seleção em Nitrogênio Levedura Base sem aminoácidos (Difco Yeast Nitrogen Base without Amino Acids) suplementado com Formedium Drop-Out (Kaiser, DSCK162), uracila e 10 g/L de glicose ou etanol. As colônias assim obtidas foram designadas CPN101, 111, 121 e 131, respectivamente, e foram usadas para modificações adicionais.

B. Supressão de IspA endógeno

[00422] Para este exemplo, um pedaço de DNA é gerado por PCR. Os protocolos de reação em cadeia de polimerase são feitos de acordo com o método descrito no Exemplo 26(A), acima. O molde é um plasmídio contendo um gene URA3 e seu promotor flanqueado pelo sítio loxP (veja o exemplo 26(A), acima), e o iniciador de sentido direto continha 50 bp de homologia à porção a montante de ERG20 seguido de 25 bp que permitem anelamento ao cassete de loxP-URA3-loxP, enquanto o iniciador de sentido reverso continha 50 bp de homologia à porção a jusante de ERG20 (na orientação reversa ao iniciador de sentido direto) seguido de 25 bp que permitem anelamento ao cassete loxP-URA3-loxP.

[00423] O produto de PCR assim obtido é transformado em CPN101, 111, 121 e 131 usando o kit de transformação de levedura

Sigma de acordo com o protocolo do fabricante (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo, EUA). Os transformantes são selecionados em Nitrogênio Levedura Base sem aminoácidos (Difco Yeast Nitrogen Base without Amino Acids) suplementado com Formedium Drop-Out (Kaiser, DSCK162), histidina e 10 g/L de glicose ou etanol. Após re-estriar uma colônia mais uma vez nas mesmas placas, a presença do inserto da direita é verificado por PCR usando DNA cromossômico de uma colônia que cresce nestas placas. O marcador de URA3 é espiralizado conforme descrito no exemplo 26(A), acima, e uma colônia derivada de cada CPN101, 111, 121 e 131 é verificada por PCR e, se estiverem corretas, chamadas CPN102, 112, 122 e 132.

C. Construção de S. cerevisiae CPN103, 113, 123 e 133 que contêm ERG20 atrás de seu promotor endógeno ou promotor alternativo, e que pode produzir isopreno

[00424] Dois plasmídeos, um expressando o gene URA3, o outro expressando o gene HIS3, e juntos expressando um ou mais dos polipeptídeos da rota MVA necessários para produzir isopreno a partir de acetil-CoA, são transformados em CPN102, 112, 122 e 132 usando o kit de transformação de levedura Sigma. As colônias são selecionadas em Nitrogênio Levedura Base sem aminoácidos (Difco Yeast Nitrogen Base without Amino Acids) suplementado com Formedium Drop-Out (Kaiser, DSCK162) e 10 g/L de glicose ou etanol. Uma colônia de cada foi selecionada, foram designadas CPN103, 113, 123 e 133 respectivamente, e testadas para a produção de isopreno.

SEQUÊNCIAS

MTDVRFRIIGTGAYVPERIVSNDEVGAPAGVDDDWITRKTGIRQ
RRWAADDQATSDLATAAGRAALKAA-
ITPEQLTVIAVATSTPDRPQPPTAAYVQHHLG
ATGTAAFDVNAVCSGTVFALSSVAG-
LVYRGGYALVIGADLYSRILNPADRKTVVLFG

DGAGAMVLGPTSTGTGPIVRRVALH-
FGGLTDLIRVPAGGSRQPLDTDGLDAGLQYFA
MDGREVRRFVTEHLPQLIKGFLHEA-
VDAADISHFVPHQANGVMLDEVFGELHLPRAT
MHRTVETYGNTGAASIPITMDAAVR-
GSFRPGELVLLAGFGGGMAASFALIEW (**SEQ ID NO: 1**).

atggttaaagacattgtaataattgatgccctccgtactcccatcggtaagtaccgcggtca
gctctcaaagatgacggcggtggaattgggaaccgcagttacaaaggctctgttcgagaagaacgacca
ggtcaaagaccatgtagaacaagtcatttttggcaacgttttacaggcagggaacggccagaatcccgcc
cgtcagatcgcccttaattctggcctgtccgcagagataccggcttcgactattaaccaggtgtgtggttctgg
cctgaaagcaataagcatggcgcgccaacagatcctactcggagaagcggaagtaatagtagcagga
ggtatcgaatccatgacgaatgcgccgagtattacatattataataaagaagaagacaccctctcaaagc
ctgttcctacgatgaccttcgatggtctgaccgacgcgtttagcggaaagattatgggtttaacagccgaaa

atgttgccgaacagtacggcgtatcacgtgaggcccaggacgcctttgcgtatggatcgcagatgaaagc
agcaaaggcccaagaacagggcattttcgcagctgaaatactgcctcttgaaataggggacgaagttatt
actcaggacgaggggttcgtcaagagaccaccctcgaaaaattaagtctgcttcggaccatttttaaaga
agatggtactgttacagcgggcaacgcctcaacgatcaatgatggcgcctcagccgtgatcattgcatcaa
aggagtttgctgagacaaaccagattccctaccttgcgatcgtacatgatattacagagataggcattgatc
catcaataatgggcattgctcccgtgagtgcgatcaataaactgatcgatcgtaaccaaattagcatggaa
gaaatcgatctctttgaaattaatgaggcatttgcagcatcctcggtggtagttcaaaaagagttaagcattc
ccgatgaaaagatcaatattggcggttccggtattgcactaggccatcctcttggcgccacaggagcgcgc
attgtaaccaccctagcgcaccagttgaaacgtacacacggacgctatggtattgcctccctgtgcattggc
ggtggccttggcctagcaatattaatagaagtgcctcaggaagatcagccggttaaaaaattttatcaattg
gcccgtgaggaccgtctggctagacttcaggagcaagccgtgatcagcccagctacaaaacatgtactg
gcagaaatgacacttcctgaagatattgccgacaatctgatcgaaaatcaaatatctgaaatggaaatccc
tcttggtgtggctttgaatctgagggtcaatgataagagttataccatcccactagcaactgaggaaccgagt
gtaatcgctgcctgtaataatggtgcaaaaatggcaaaccacctgggcggttttcagtcagaattaaaaga
tggtttcctgcgtgggcaaattgtacttatgaacgtcaaagaacccgcaactatcgagcatacgatcacgg
cagagaaagcggcaatttttcgtgccgcagcgcagtcacatccatcgattgtgaaacgaggtgggggtct

aaaagagatagtagtgcgtacgttcgatgatgatccgacgttcctgtctattgatctgatagttgatactaaag
acgcaatgggcgctaacatcattaacaccattctcgagggtgtagccggctttctgagggaaatccttaccg

aagaaattctgttctctattttatctaattacgcaaccgaatcaattgtgaccgccagctgtcgcataccttacg
aagcactgagtaaaaaaggtgatggtaaacgaatcgctgaaaaagtggctgctgcatctaaatttgccca
gttagatccttatcgagctgcaacccacaacaaaggtattatgaatggtattgaggccgtcgttttggcctca
ggaaatgacacacgggcggtcgcggcagccgcacatgcgtatgcttcacgcgatcagcactatcgggg
cttaagccagtggcaggttgcagaaggcgcgttacacggggagatcagtctaccacttgcactcggcagc
gttggcggtgcaattgaggtcttgcctaaagcgaaggcggcattcgaaatcatggggatcacagaggcg
aaggagctggcagaagtcacagctgcggtagggctggcgcaaaacctggcggcgttaagagcgcttgtt
agtgaaggaatacagcaaggtcacatgtcgctccaggctcgctctcttgcattatcggtaggtgctacagg
caaggaagttgaaatcctggccgaaaaattacagggctctcgtatgaatcaggcgaacgctcagaccat
actcgcagagatcagatcgcaaaaagttgaattgtga **SEQ ID NO:2**

atgaccatgaacgttggaatcgataaaatgtcattctttgttccaccttactttgtggacatgact
gatctggcagtagcacgggatgtcgatcccaataagtttctgattggtattggccaggaccagatggcagttaat
ccgaaaacgcaggatattgtgacatttgccacaaatgctgccaaaaacatactgtcagctgaggaccttgata
aaattgatatggtcatagtcggcaccgagagtggaatcgatgaatccaaagcgagtgccgtagtgcttcacag
gttgctcggtatccagaagtttgctcgctcctttgaaatcaaagaagcctgttatgggggtaccgcggctttacagt
tcgctgtaaacacattaggaatcatcctgaatcaaaggttcttgtagttgcatcagatatcgcgaaatacggcct
ggcttctggaggtgaaccaacgcaaggtgcaggcgctgtggctatgctcgtctcaactgaccctaagatcattg
ctttcaacgacgatagcctcgcgcttacacaagatatctatgacttctggcgaccagttggacatgactatcctat
ggtcgacgggcctcttagtacagagacctacatccagtcatttcagaccgtatggcaggaatacacaaaacg
gtcgcagcatgcactggcagactttgctgcccttagctttcatatcccgtatactaaaatgggcaaaaaggcgct
gcttgcaatccttgaaggcgaatcagaggaggctcagaaccgtatactagcaaaatatgaaaagagtatagc
ctactccagaaaggcgggtaacctgtataccggtagcctgtatctaggacttatttcacttctggaaaatgcaga
agaccttaaagctggtgatttaataggcctcttttcttacggttccggtgctgttgcggagtttttctcaggaaggctg
gttgaggactatcaggaacagctacttaaaacaaaacatgccgaacagctggcccatagaaagcaactga
caatcgaggagtacgaaacgatgttctccgatcgcttggacgtggacaaagacgccgaatacgaagacac
attagcttatagcatttcgtcagtccgaaacaccgtacgtgagtacaggagttga **SEQ ID NO:3**

atgaaagaagtggttatgattgatgcggctcgcacacccattgggaaatacagaggtag
tcttagtccttttacagcggtggagctggggacactggtcacgaaagggctgctggataaaacaaagctta
agaaagacaagatagaccaagtgatattcggcaatgtgcttcaggcaggaaacggacaaaacgttgca
agacaaatagccctgaacagtggcttaccagttgacgtgccggcgatgactattaacgaagtttgcgggtc
cggaatgaaagcggtgattttagcccgccagttaatacagttaggggaggcagagttggtcattgcaggg
ggtacggagtcaatgtcacaagcacccatgctgaaaccttaccagtcagagaccaacgaatacggaga

gccgatatcatcaatggttaatgacgggctgacggatgcgttttccaatgctcacatgggtcttactgccgaa
aaggtggcgacccagttttcagtgtcgcgcgaggaacaagaccggtacgcattgtccagccaattgaaa
gcagcgcacgcggttgaagccggggtgttctcagaagagattattccggttaagattagcgacgaggatg
tcttgagtgaagacgaggcagtaagaggcaacagcactttggaaaaactgggcaccttgcggacggtgt
tttctgaagagggcacggttaccgctggcaatgcttcaccgctgaatgacggcgctagtgtcgtgattcttgc
atcaaaagaatacgcggaaaacaataatctgccttacctggcgacgataaaggaggttgcggaagttgg
tatcgatccttctatcatgggtattgccccaataaaggccattcaaaagttaacagatcggtcgggcatgaa
cctgtccacgattgatctgttcgaaattaatgaagcattcgcggcatctagcattgttgtttctcaagagctgca
attggacgaagaaaaagtgaatatctatggcggggcgatagctttaggccatccaatcggcgcaagcgg
agcccggatactgacaaccttagcatacggcctcctgcgtgagcaaaagcgttatggtattgcgtcattatg
tatcggcggtggtcttggtctggccgtgctgttagaagctaatatggagcagacccacaaagacgttcaga
agaaaaagttttaccagcttacccctccgagcggagatcgcagcttatcgagaagaacgttctgactcaa
gaaacggcacttattttccaggagcagacgttgtccgaagaactgtccgatcacatgattgagaatcaggt
ctccgaagtggaaattccaatgggaattgcacaaaattttcagattaatggcaagaaaaaatggattcctat

ggcgactgaagaaccttcagtaatagcggcagcatcgaacggcgccaaaatctgcgggaacatttgcg
cggaaacgcctcagcggcttatgcgcgggcagattgtcctgtctggcaaatcagaatatcaagccgtgat
aaatgccgtgaatcatcgcaaagaagaactgattctttgcgcaaacgagtcgtacccgagtattgttaaac
gcgggggaggtgttcaggatatttctacgcgggagtttatgggttcttttcacgcgtatttatcaatcgactttct
ggtggacgtcaaggacgcaatgggggcaaacatgatcaactctattctcgaaagcgttgcaaataaactg
cgtgaatggttcccggaagaggaaatactgttctccatcctgtcaaacttcgctacggagtccctggcatctg
catgttgcgagattccttttgaaagacttggtcgtaacaaagaaattggtgaacagatcgccaagaaaattc
aacaggcaggggaatatgctaagcttgacccttaccgcgcggcaacccataacaaggggattatgaac
ggtatcgaagccgtcgttgccgcaacgggaaacgacacacgggctgtttccgcttctattcacgcatacgc
cgcccgtaatggcttgtaccaaggtttaacggattggcagatcaagggcgataaactggttggtaaattaa
cagtcccactggctgtggcgactgtcggtggcgcgtcgaacatattaccaaaagccaaagcttccctcgcc
atgctggatattgattccgcaaaagaactggcccaagtgatcgccgcggtaggtttagcacagaatctggc
ggcgttacgtgcattagtgacagaaggcattcagaaaggacacatgggcttgcaagcacgttctttagcga
tttcgataggtgccatcggtgaggagatagagcaagtcgcgaaaaaactgcgtgaagctgaaaaaatga
atcagcaaacggcaatacagattttagaaaaaattcgcgagaaatga **SEQ ID NO:4**

atgaaaatcggtattgaccgtctgtccttcttcatcccgaatttgtatttggacatgactgagctg
gcagaatcacgcggggatgatccagctaaatatcatattggaatcggacaagatcagatggcagtgaatcgc
gcaaacgaggacatcataacactgggtgcaaacgctgcgagtaagatcgtgacagagaaagaccgcgag

ttgattgatatggtaatcgttggcacggaatcaggaattgaccactccaaagcaagcgccgtgattattcaccat
ctccttaaaattcagtcgttcgcccgttctttcgaggtaaaagaagcttgctatggcggaactgctgccctgcacat
ggcgaaggagtatgtcaaaaatcatccggagcgtaaggtcttggtaattgcgtcagacatcgcgcgttatggttt
ggccagcggaggagaagttactcaaggcgtgggggccgtagccatgatgattacacaaaaccccccggattc
tttcgattgaagacgatagtgtttttctcacagaggatatctatgatttctggcggcctgattactccgagttcctgta
gtggacgggccccttcaaactcaacgtatatagagagttttcagaaagtttggaaccggcacaaggaattgtc
cggaagagggctggaagattatcaagctattgcttttcacataccctatacgaagatgggtaagaaagcgctc
cagagtgttttagaccaaaccgatgaagataaccaggagcgcttaatggctagatatgaggagtctattcgcta
tagccggagaattggtaacctgtacacaggcagcttgtaccttggtcttacaagcttgttggaaaactctaaaag
tttacaaccgggagatcggatcggcctcttttcctatggcagtggtgcggtgtccgagttctttaccgggtatttaga
agaaaattaccaagagtacctgttcgctcaaagccatcaagaaatgctggatagccggactcggattacggtc
gatgaatacgagaccatcttttcagagactctgccagaacatggtgaatgcgccgaatatacgagcgacgtcc
ccttttctataaccaagattgagaacgacattcgttattataaaatctga **SEQ ID NO:5**

atggaagaagtggtaattatagatgcacgtcggactccgattggtaaatatcacgggtcg
ttgaagaagttttcagcggtggcgctggggacggccgtggctaaagacatgttcgaacgcaaccagaaa
atcaaagaggagatcgcgcaggtcataattggtaatgtcttgcaggcaggaaatggccagaaccccgcg
cggcaagttgctcttcaatcagggttgtccgttgacattcccgcttctacaattaacgaggtttgtgggtctggtt
tgaaagctatcttgatgggcatggaacaaatccaactcggcaaagcgcaagtagtgctggcaggcggca
ttgaatcaatgacaaatgcgccaagcctgtcccactataacaaggcggaggatacgtatagtgtcccagt
gtcgagcatgacactggatggtctgacagacgcattttctagtaaacctatgggattaacagcggaaaacg
tcgcacagcgctacggtatctcccgtgaggcgcaagatcaattcgcatatcaatctcagatgaaagcagc
aaaagcgcaggcagaaaacaaattcgctaaggaaattgtgccactggcgggtgaaactaaaaccatca
cagctgacgaagggatcagatcccaaacaacgatggagaaactggcaagtctcaaacctgtttttaaaa
ccgatggcactgtaaccgcagggaatgctagcaccattaatgacggggccgcccttgtgctgcttgctagc
aaaacttactgcgaaactaatgacataccgtaccttgcgacaatcaaagaaattgttgaagttggaatcga
tccggagattatgggcatctctccgataaaagcgatacaaacattgttacaaaatcaaaaagttagcctcg
aagatattggagtttttgaaataaatgaagcctttgccgcaagtagcatagtggttgaatctgagttgggatta
gatccggctaaagttaaccgttatgggggtggtatatccttaggtcatgcaattggggcaaccggcgctcgc
ctggccacttcactggtgtatcaaatgcaggagatacaagcacgttatggtattgcgagcctgtgcgttggtg
gtggacttggactggcaatgcttttagaacgtccaactattgagaaggctaaaccgacagacaaaaagttc
tatgaattgtcaccagctgaacggttgcaagagctggaaaatcaacagaaaatcagttctgaaactaaac
agcagttatctcagatgatgcttgccgaggacactgcaaaccatttgatagaaaatcaaatatcagagatt

gaactcccaatgggcgtcgggatgaacctgaaggttgatgggaaagcctatgttgtgccaatggcgacgg
aagagccgtccgtcatcgcggccatgtctaatggtgccaaaatggccggcgaaattcacactcagtcgaa
agaacggctgctcagaggtcagattgttttcagcgcgaagaatccgaatgaaatcgaacagagaatagc
tgagaaccaagctttgattttcgaacgtgccgaacagtcctatccttccattgtgaaaagagagggaggtct
ccgccgcattgcacttcgtcattttcctgccgattctcagcaggagtctgcggaccagtccacatttttatcagt
ggacctttttgtagatgtgaaagacgcgatgggggcaaatatcataaatgcaatacttgagggcgtcgcag
ccctgtttcgcgaatggttccccaatgaggaaattctttttctattctctcgaacttggctacggagagcttagtc
acggctgtttgtgaagtcccatttagtgcacttagcaagagaggtggtgcaacggtggcccagaaaattgt
gcaggcgtcgctcttcgcaaagacagacccataccgcgcagtgacccacaacaaagggattatgaacg
gtgtagaggctgttatgcttgccacaggcaacgacacgcgcgcagtctcagccgcttgtcatggatacgca
gcgcgcaccggtagctatcagggtctgactaactggacgattgagtcggatcgcctggtaggcgagataa
cactgccgctggccatcgctacagttggaggcgctaccaaagtgttgcccaaagctcaagcggcactgg
agattagtgatgttcactcttctcaagagcttgcagccttagcggcgtcagtaggtttagtacaaaatctcgcg
gccctgcgcgcactggtttccgaaggtatacaaaaagggcacatgtccatgcaagcccggtctctcgcaa
tcgcggtcggtgctgaaaaagccgagatcgagcaggtcgccgaaaagttgcggcagaacccgccaat
gaatcagcagcaggcgctccgttttcttggcgagatccgcgaacaatga **SEQ ID NO:6**

atgaacgtcggcattgacaaaattaatttttcgttccaccgtattatctggatatggtcgacctg
gcccacgcacgcgaagtggacccgaacaaatttacaattggaattggacaggatcagatggctgtgagcaa
aaagacgcacgatatcgtaacattcgcggctagtgccgcgaaggaaattttagaacctgaggacttgcaagc
tatagacatggttatagttggtaccgaatcgggcattgacgagagcaaagcatccgcggtcgttttacatcgtttg
ttgggcgtacaacctttcgctcgcagttttgaaattaaagaagcctgttacggggcaaccgcaggcattcagtttg
ccaagactcatatacaagcgaacccggagagcaaggtcctggtaattgcaagcgatatagctcggtatggtct
tcggtcaggtggagagcccacacaaggcgcaggggcagttgctatgcttctcacggcaaatcccagaatcct
gaccttcgaaaacgacaatctgatgttaacgcaggatatttatgacttctggagaccacttggtcacgcttaccct
atggtagatggccacctttccaatcaagtctatattgacagttttaagaaggtctggcaagcacattgcgaacgc
aatcaagcttctatatccgactatgccgcgattagttttcatattccgtatacaaaaatgggtaagaaagccctgct
cgctgtttttgcagatgaagtggaaactgaacaggaacgcgttatggcacggtatgaagagtctatcgtatattc
acgccggatcggcaacttgtatacgggatcattgtacctggggctgatatccttattggaaaacagttctcacctg
tcggcgggcgaccggataggattgtttagttatgggagtggcgctgtcagcgaatttttctccggtcgtttagtggc
aggctatgaaaatcaattgaacaaagaggcgcatacccagctcctggatcagcgtcagaagctttccatcga
agagtatgaggcgatttttacagattccttagaaattgatcaggatgcagcgttctcggatgacctgccatattcc
atccgcgagataaaaaacacgattcggtactataaggagagctga **SEQ ID NO:7**

atggaagaagttgtcatcattgacgcactgcgtactccaataggaaagtaccacggttc
gctgaaagattacacagctgttgaactggggacagtagcagcaaaggcgttgctggcacgaaatcag
caagcaaaagaacacatagcgcaagttattattggcaacgtcctgcaagccggaagtgggcagaatc
caggccgacaagtcagtttacagtcaggattgtcttctgatatccccgctagcacgatcaatgaagtgtgt
ggctcgggtatgaaagcgattctgatgggtatggagcaaattcagctgaacaaagcctctgtggtcttaa
caggcggaattgaaagcatgaccaacgcgccgctgtttagttattacaacaaggctgaggatcaatattc
ggcgccggttagcacaatgatgcacgatggtctaacagatgctttcagttccaaaccaatgggcttaacc
gcagagaccgtcgctgagagatatggaattacgcgtaaggaacaagatgaatttgcttatcactctcaa
atgaaggcggccaaagcccaggcggcgaaaaagtttgatcaggaaattgtacccctgacggaaaaat
ccggaacggttctccaggacgaaggcatcagagccgcgacaacagtcgagaagctagctgagctta
aaacggtgttcaaaaaagacggaacagttacagcgggtaacgcctctacgataaatgatggcgctgct
atggtattaatagcatcaaaatcttattgcgaagaacaccagattccttatctggccgttataaaggagatc
gttgaggtgggttttgcccccgaaataatgggtatttcccccattaaggctatagacaccctgctgaaaaat

caagcactgaccatagaggatataggaatatttgagattaatgaagcctttgctgcgagttcgattgtggta
gaacgcgagttgggcctggaccccaaaaaagttaatcgctatggcggtggtatatcactcggccacgc
aattggggcgacgggagctcgcattgcgacgaccgttgcttatcagctgaaagatacccaggagcgct
acggtatagcttccttatgcgttggtgggggtcttggattggcgatgcttctggaaaacccatcggccactg
cctcacaaactaattttgatgaggaatctgcttccgaaaaaactgagaagaagaagtttttatgcgctagct
cctaacgaacgcttagcgtttttggaagcccaaggcgctattaccgctgctgaaaccctggtcttccagga
gatgaccttaaacaaagagacagccaatcacttaatcgaaaaccaaatcagcgaagttgaaattccttt
aggcgtgggcctgaacttacaggtgaatgggaaagcgtataatgttcctctggccacggaggaaccgtc
cgttatcgctgcgatgtcgaatggcgccaaaatggctggtcctattacaacaacaagtcaggagaggct
gttacggggtcagattgtcttcatggacgtacaggacccagaagcaatattagcgaaagttgaatccga
gcaagctaccattttcgcggtggcaaatgaaacatacccgtctatcgtgaaaagaggaggaggtctgcg
tagagtcattggcaggaatttcagtccggccgaaagtgacttagccacggcgtatgtatcaattgacctga
tggtagatgttaaggatgcaatgggtgctaatatcatcaatagtatcctagaaggtgttgcggaattgtttag
aaaatggttcccagaagaagaaatcctgttctcaattctctccaatctcgcgacagaaagtctggtaacg
gcgacgtgctcagttccgtttgataaattgtccaaaactgggaatggtcgacaagtagctggtaaaatagt
gcacgcggcggactttgctaagatagatccatacagagctgccacacacaataaaggtattatgaatgg
cgttgaagcgttaatcttagccaccggtaatgacacccgtgcggtgtcggctgcatgccacggttacgcg
gcacgcaatgggcgaatgcaagggcttacctcttggacgattatcgaagatcggctgataggctctatca

cattacctttggctattgcgacagtgggggtgccacaaaaatcttgccaaaagcacaggccgccctgg
cgctaactggcgttgagacggcgtcggaactggccagcctggcggcgagtgtgggattagttcaaaattt
ggccgctttacgagcactagtgagcgagggcattcagcaagggcacatgagtatgcaagctagatccc
tggccattagcgtaggtgcgaaaggtactgaaatagagcaactagctgcgaagctgagggcagcgac
gcaaatgaatcaggagcaggctcgtaaatttctgaccgaaataagaaattaa **SEQ ID NO:8**

atgaacgttggaattgataaaatcaatttttcgttccgccctatttcattgatatggtggatctcgc
tcatgcaagagaagttgaccccaacaagttcactataggaataggccaagatcagatggcagtaaacaaga
aaacgcaagatatcgtaacgttcgcgatgcacgccgcgaaggatattctgactaaggaagatttacaggcca
tagatatggtaatagtggggactgagtctgggatcgacgagagcaaggcaagtgctgtcgtattgcatcggctt
ttaggtattcagccttttgcgcgctcctttgaaattaaggaggcatgctatggggccactgccggccttcagtttgc
aaaagctcatgtgcaggctaatccccagagcaaggtcctggtggtagcttccgatatagcacgctacggactg
gcatccggaggagaaccgactcaaggtgtaggtgctgtggcaatgttgatttccgctgatccagctatcttgcag
ttagaaaatgataatctcatgttgacccaagatatatacgatttttggcgcccggtcgggcatcaatatcctatggt
agacggccatctgtctaatgccgtctatatagacagctttaaacaagtctggcaagcacattgcgagaaaaac

caacggactgctaaagattatgctgcattgtcgttccatattccgtacacgaaaatgggtaagaaagctctgtta
gcggtttttgcggaggaagatgagacagaacaaaagcggttaatggcacgttatgaagaatcaattgtataca
gtcgtcggactggaaatctgtatactggctcactctatctgggctgatttccttactggagaatagtagcagtttac
aggcgaacgatcgcataggtctgtttagctatggttcaggggccgttgcggaatttttcagtggcctcttggtaccg
ggttacgagaaacaattagcgcaagctgcccatcaagctcttctggacgaccggcaaaaactgactatcgca
gagtacgaagccatgtttaatgaaaccattgatattgatcaggaccagtcatttgaggatgacttactgtactcca
tcagagagatcaaaaacactattcgctactataacgaggagaatgaataa **SEQ ID NO:9**

REIVINDICAÇÕES

1. Células recombinantes capazes de produzir isopreno, caracterizadas pelo fato de que compreendem um gene *ispA* tendo atividade funcional diminuída e um ou mais ácidos nucleicos que codificam:

(a) um polipeptídeo de isopreno sintase, sendo que o polipeptídeo de isopreno sintase é codificado por um ácido nucleico heterólogo; e

(b) um ou mais polipeptídeos da rota do mevalonato (MVA),

sendo que a cultura das ditas células recombinantes em um meio adequado proporciona a produção dos ditos polipeptídeos e a síntese de isopreno.

2. Células recombinantes, de acordo com a reivindicação 1, caracterizadas pelo fato que a atividade funcional do gene *ispA* é diminuída por:

a. deleção do gene*ispA*;

b. diminuição da expressão gênica de *ispA*;

c. diminuição da atividade de proteína de *ispA*;

d. diminuição da expressão de proteína de *ispA*; ou

e. modulação temporária da expressão de *ispA*.

3. Células recombinantes, de acordo com a reivindicação 2, caracterizadas pelo fato de que a expressão gênica de *ispA* é diminuída pela (a) colocação do gene *ispA* sob o controle de um promotor fraco; (b) colocação do gene *ispA* sob controle de um promotor autorregulatório; ou (c) uma proteína repressora transcricional HrcA.

4. Células recombinantes, de acordo com a reivindicação 2, caracterizadas pelo fato de que a atividade de proteína de *ispA* é diminuída pela (a) fusão traducional da proteína *ispA* com uma etiqueta proteolítica; (b) uso de um RNA antissenso; (c) introdução de uma ou mais mutações em um sítio de ligação ribossomal localizado na molé-

cula de mRNA de ispA; (d) substituição do gene endógeno *ispA* por um gene que codifica um polipeptídeo compreendendo um Km aumentado para DMAPP em comparação com o Km do polipeptídeo codificado pelo gene endógeno *ispA*; ou (e) substituição do gene endógeno *ispA* por um outro gene compreendendo um ótimo de temperatura diferente.

5. Células recombinantes, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizadas pelo fato de que o polipeptídeo de isopreno sintase é um polipeptídeo de isopreno sintase de planta ou variante do mesmo.

6. Células recombinantes, de acordo com a reivindicação 5, caracterizadas pelo fato de que o polipeptídeo de isopreno sintase é um polipeptídeo de *Pueraria* ou *Populus* ou um híbrido, *Populus alba x Populus tremula* ou variante dos mesmos.

7. Células recombinantes, de acordo com a reivindicação 6, caracterizadas pelo fato de que o polipeptídeo de isopreno sintase é selecionado do grupo que consiste em *Pueraria montana* ou *Pueraria lobata*, *Populus tremuloides*, *Populus alba* ou variante dos mesmos, *Populus nigra,* e *Populus trichocarpa* ou variante dos mesmos.

8. Células recombinantes, de acordo com a reivindicação 5, caracterizadas pelo fato de que o polipeptídeo de isopreno sintase é um polipeptídeo de isopreno sintase de kudzu ou variante do mesmo ou um polipeptídeo de isopreno sintase de *Eucalyptus* ou variante do mesmo.

9. Células recombinantes, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizadas pelo fato de que os ditos um ou mais ácidos nucleicos que codificam um ou mais polipeptídeos da rota de MVA de (b) é um ácido nucleico heterólogo.

10. Células recombinantes, de acordo com a reivindicação 9, caracterizadas pelo fato de que compreendem um ou mais ácidos

nucleicos que codificam (a) polipeptídeos da rota de MVA da rota superior de MVA, sendo que os ácidos nucleicos da rota superior de MVA são selecionados do grupo que consiste em ácidos nucleicos de AA-CoA tiolase ou acetoacetil-CoA sintase, de HMG-CoA sintase, e de HMG-CoA redutase; (b) polipeptídeos da rota de MVA da via inferior de MVA, sendo que os ácidos nucleicos da rota inferior de MVA são selecionados do grupo que consiste em ácidos nucleicos de MVK, PMK, e MVD; e (c) polipeptídeos da rota de MVA da rota completa de MVA.

11. Células, de acordo com a reivindicação 1, caracterizadas pelo fato de compreenderem, adicionalmente, um ou mais ácidos nucleicos que codificam um polipeptídeo de isopentenil-difosfato delta-isomerase (IDI).

12. Células recombinantes, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizadas pelo fato de que compreendem, adicionalmente, um polipeptídeo de 1-desoxixilulose-5-fosfato sintase (DXS).

13. Células recombinantes, de acordo com a reivindicação 12, caracterizadas pelo fato de que os ditos um ou mais ácidos nucleicos que codificam um polipeptídeo de DXS são (a) um ácido nucleico heterólogo que codifica um polipeptídeo de DXS; ou (b) uma cópia de um ácido nucleico endógeno que codifica um polipeptídeo de DXS.

14. Células recombinantes, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, caracterizadas pelo fato de que os um ou mais ácidos nucleicos heterólogos são colocados sob um promotor induzível ou um promotor constitutivo.

15. Células recombinantes, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, caracterizadas pelo fato de que os um ou mais ácidos nucleicos heterólogos são clonados em um plasmídeo multicópia.

16. Células recombinantes, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, caracterizadas pelo fato de que os um ou mais ácidos nucleicos heterólogos são integrados em um cromossomo das células.

17. Células recombinantes, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16, caracterizadas pelo fato de serem células bacterianas, algáceas, fúngicas e de levedura.

18. Células recombinantes, de acordo com a reivindicação 17, caracterizadas pelo fato de que as células são células bacterianas e em que as células bacterianas são células bacterianas gram-positivas ou células bacterianas gram-negativas.

19. Células bacterianas, de acordo com a reivindicação 18, caracterizadas por serem selecionadas do grupo que consiste em células de *E. coli*, *P. citrea*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. lentus*, *B. brevis*, *B. stearothermophilus*, *B. alkalophilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. clausii*, *B. halodurans*, *B. megaterium*, *B. coagulans*, *B. circulans*, *B. lautus*, *B. thuringiensis*, *S. albus*, *S. lividans*, *S. coelicolor*, *S. griseus*, *Pseudomonas sp.*, e *P. alcaligenes*.

20. Células recombinantes, de acordo com a reivindicação 17, caracterizadas pelo fato de serem células algáceas.

21. Células algáceas, de acordo com a reivindicação 20, caracterizadas por serem selecionadas do grupo que consiste em algas verdes, algas vermelhas, glaucófitos, cloraracniófitos, euglenófitas, cromista ou dinoflagelados.

22. Células recombinantes, de acordo com a reivindicação 17, caracterizadas por serem células fúngicas, opcionalmente, em que as células fúngicas são fungos filamentosos.

23. Células recombinantes, de acordo com a reivindicação 17, caracterizadas por serem células de levedura.

24. Células de levedura, de acordo com a reivindicação 23,

caracterizadas por serem selecionadas do grupo consistindo em *Saccharomyces sp.*, *Schizosaccharomyces sp.*, *Pichia sp.*, *ou Candida* sp.

25. Células de levedura, de acordo com a reivindicação 24, sendo que as células de levedura são caracterizadas pelo fato de serem *Saccharomyces cerevisiae*.

26. Células recombinantes de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 25, caracterizadas pelo fato de que compreendem ainda um polipeptídeo apresentando atividade fosfocetolase.

27. Composição, caracterizada por compreender as células conforme definidas em qualquer uma das reivindicações 1 a 26.

28. Método de produção de isopreno, caracterizado pelo fato de compreender: (a) cultivar as ditas células recombinantes conforme definidas em qualquer uma das reivindicações 1 a 26 em condições adequadas que proporcionem a síntese de isopreno; e (b) produzir isopreno.

29. Método, de acordo com a reivindicação 28, caracterizado por compreender, adicionalmente, a recuperação do isopreno produzido pelas ditas células recombinantes.

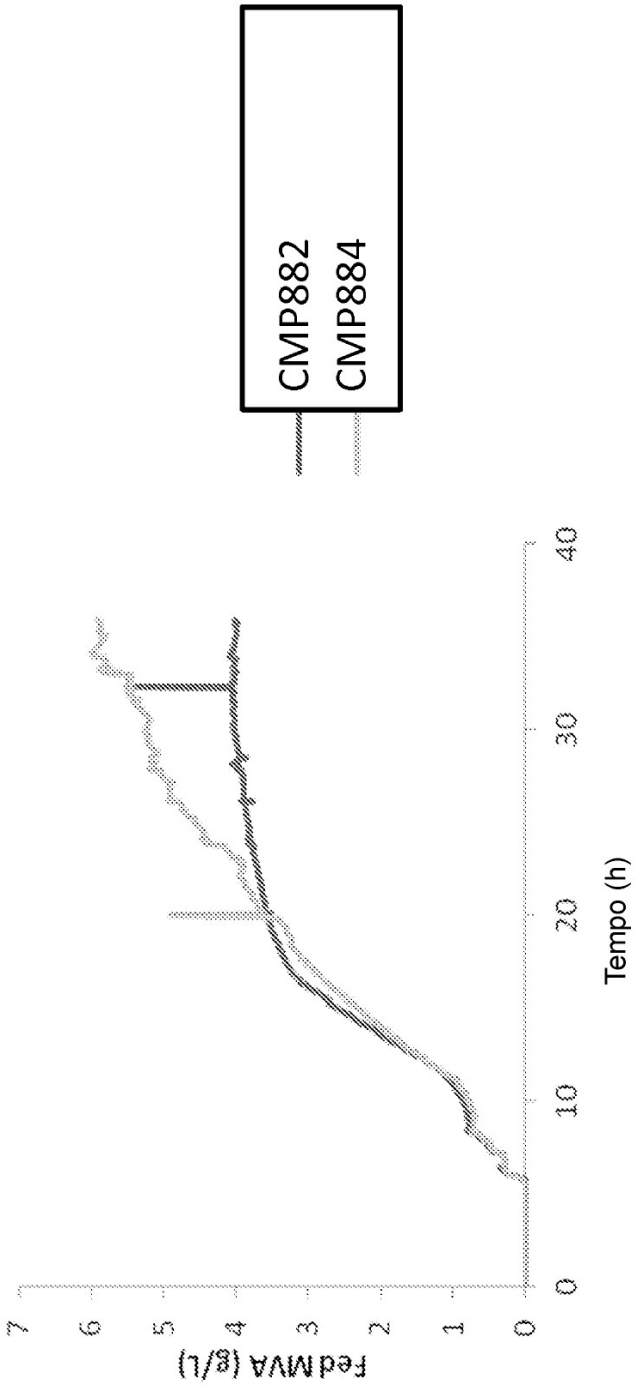


Figura 1a

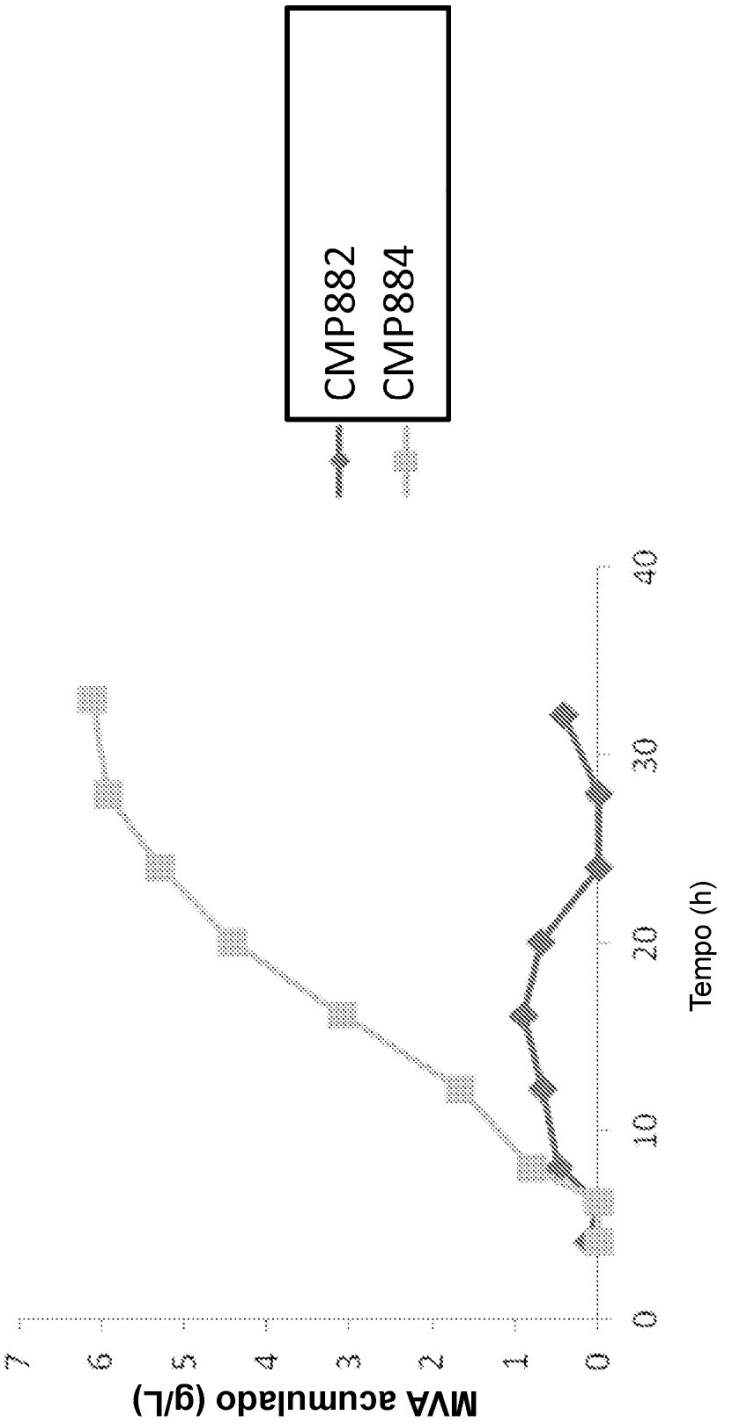


Figura 1b

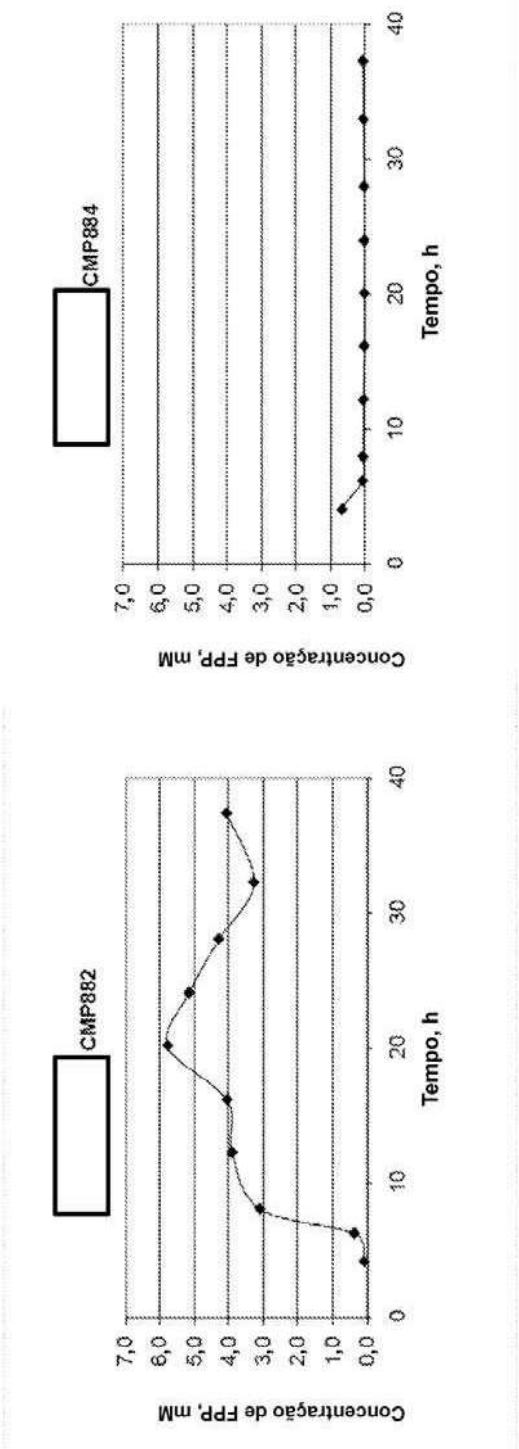

CMP884
Concentração de FPP, mM
7,0
6,0
5,0
4,0
3,0
2,0
1,0
0,0
0
10
20
30
40
Tempo, h
CMP882
Concentração de FPP, mM
7,0
6,0
5,0
4,0
3,0
2,0
1,0
0,0
0
10
20
30
40
Tempo, h

Figura 2

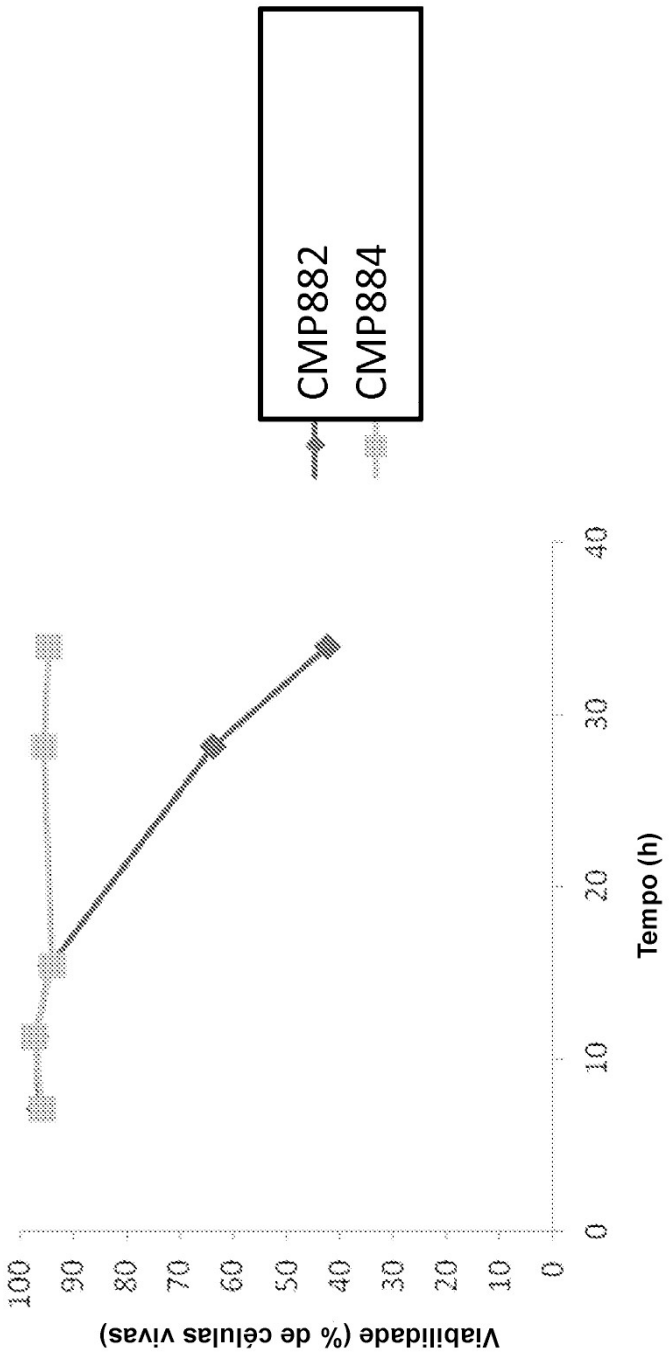

CMP882
CMP884
Viabilidade (% de células vivas)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
10
20
30
40
Tempo (h)

Figura 3

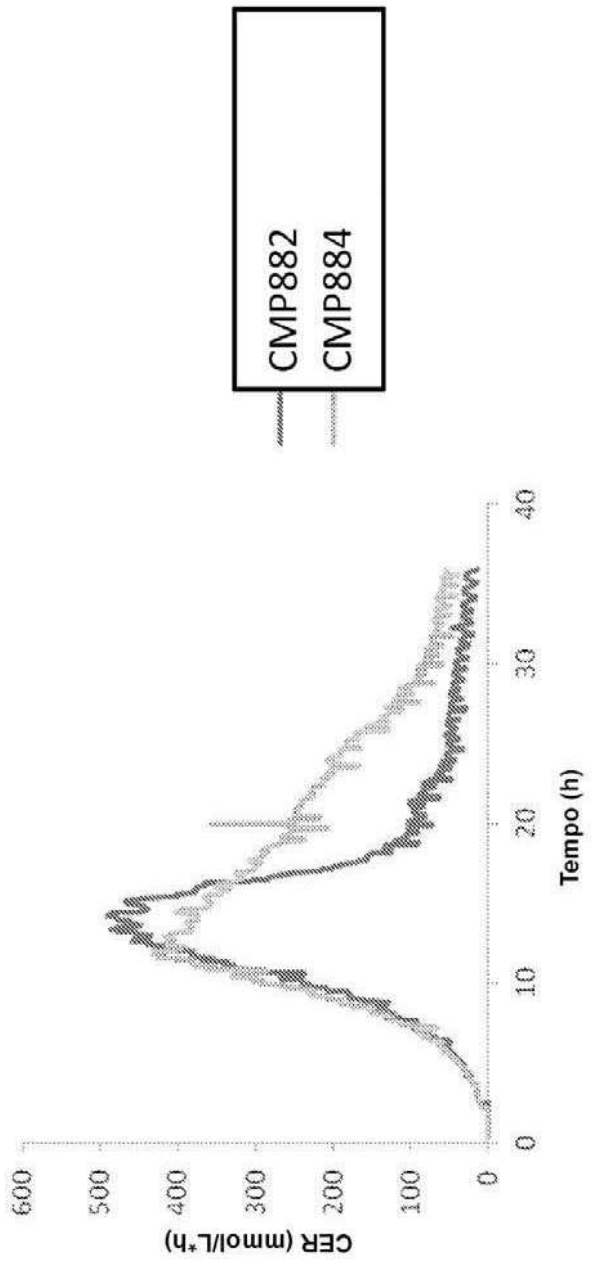

CMP882
CMP884
CER (mmol/L*h)
600
500
400
300
200
100
0
0
10
20
30
40
Tempo (h)

Figura 4

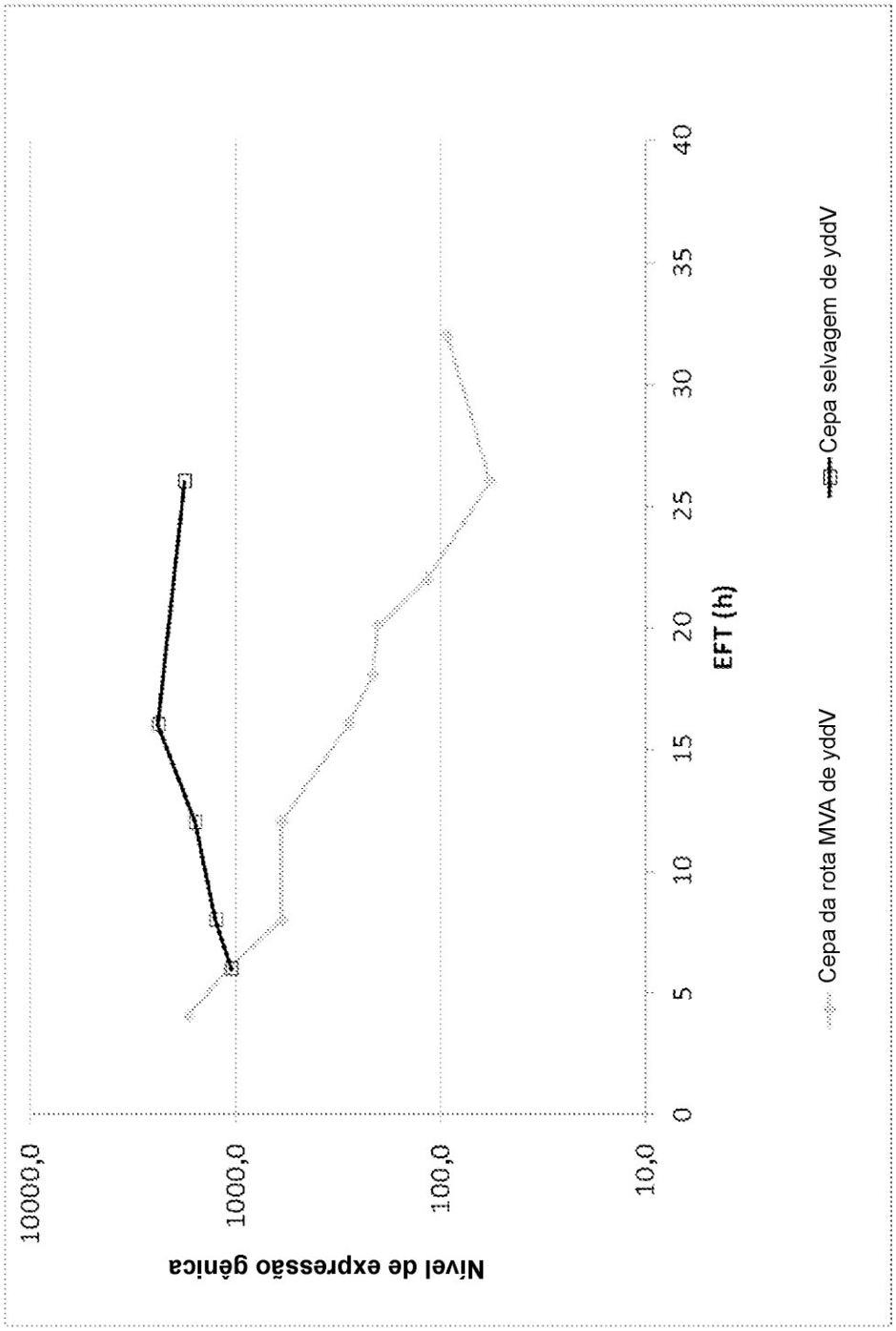

10000,0
1000,0
100,0
10,0
Nível de expressão gênica
0
5
10
15
20
25
30
35
40
EFT (h)
Cepa da rota MVA de yddV
Cepa selvagem de yddV

Figura 5

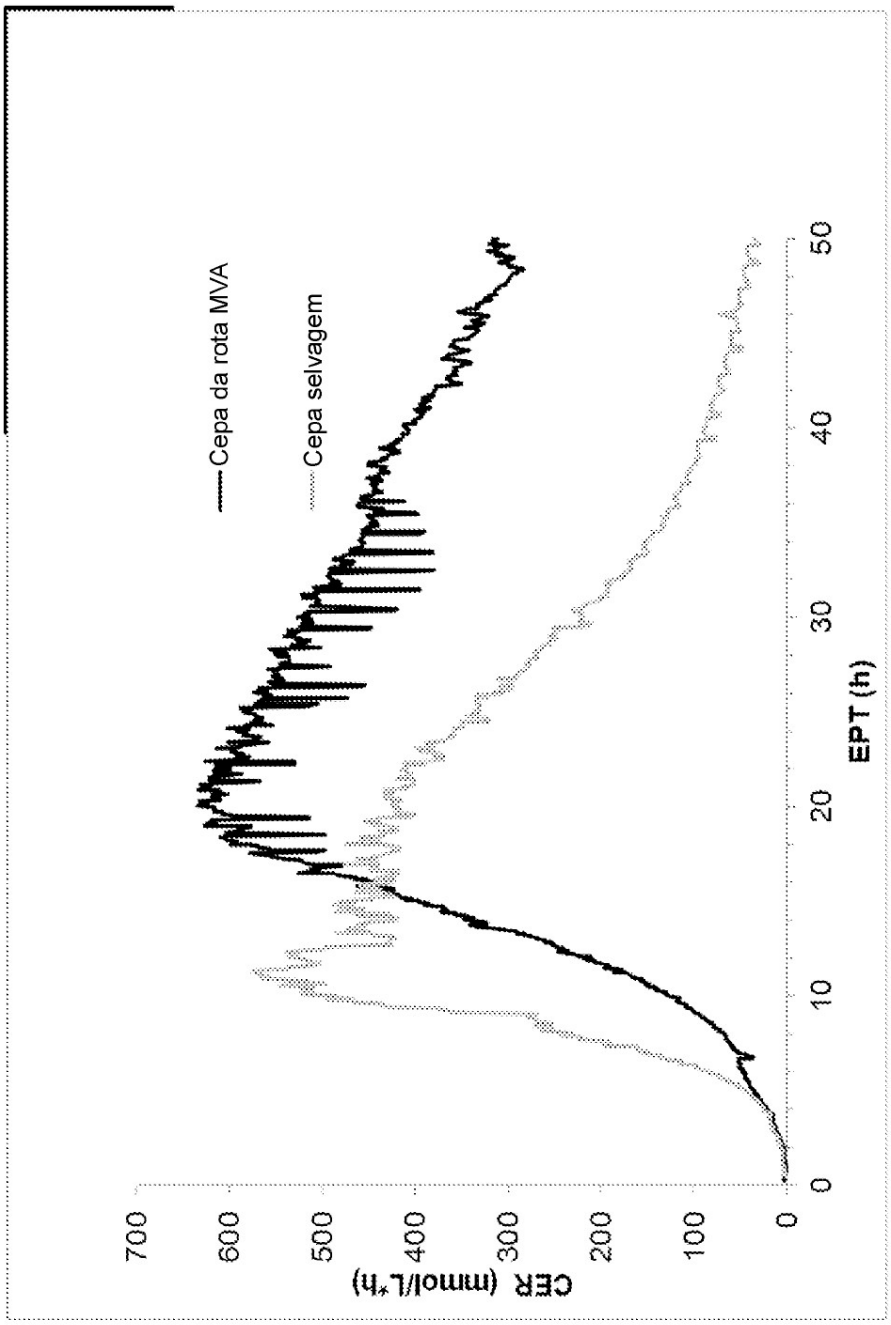

Cepa da rota MVA
Cepa selvagem
CER (mmol/L*h)
EPT (h)
0
100
200
300
400
500
600
700
0
10
20
30
40
50

Figura 6

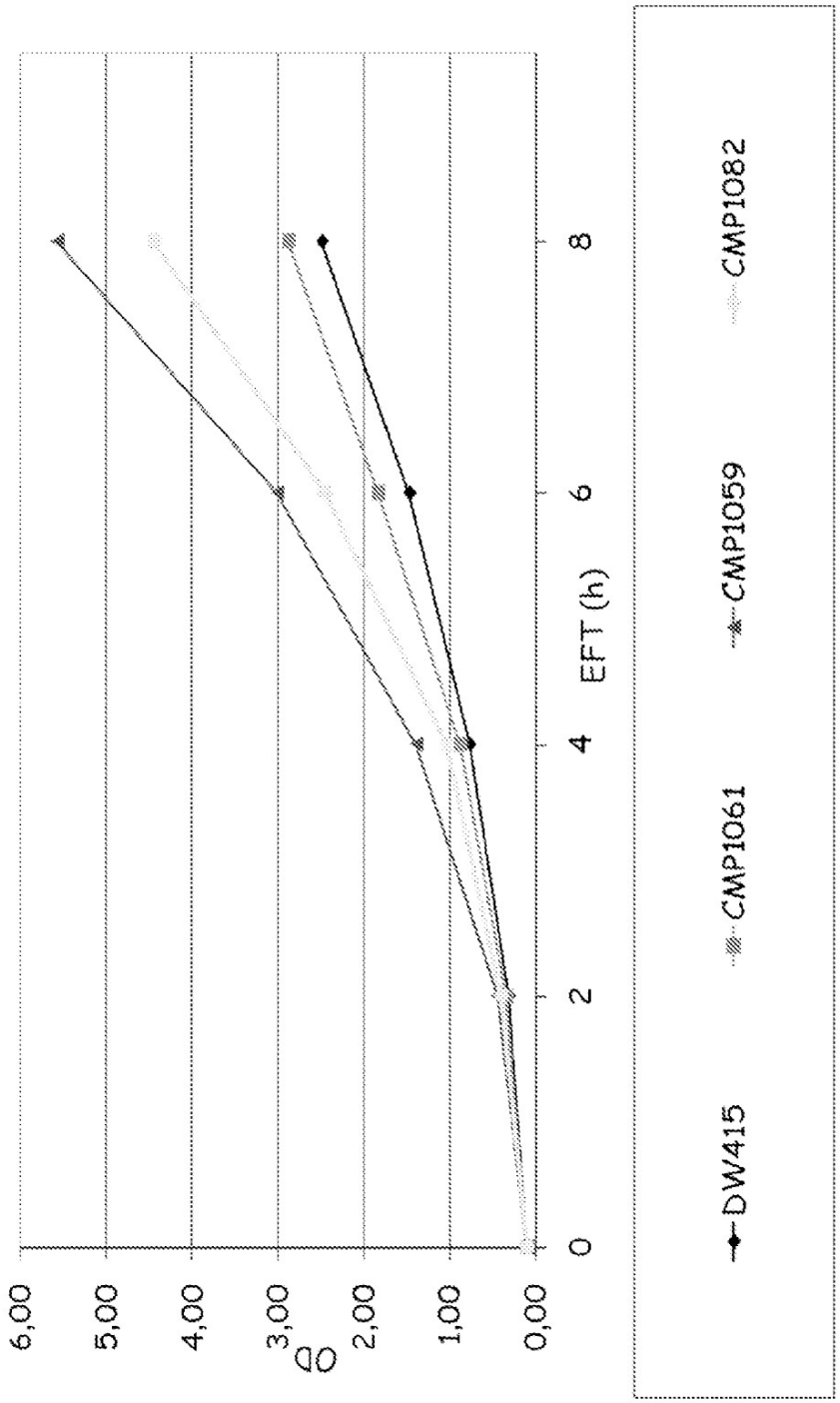

6,00
5,00
4,00
3,00
2,00
1,00
0,00
OD
0
2
4
6
8
EFT (h)
DW415
CMP1061
CMP1059
CMP1082

Figura 7a

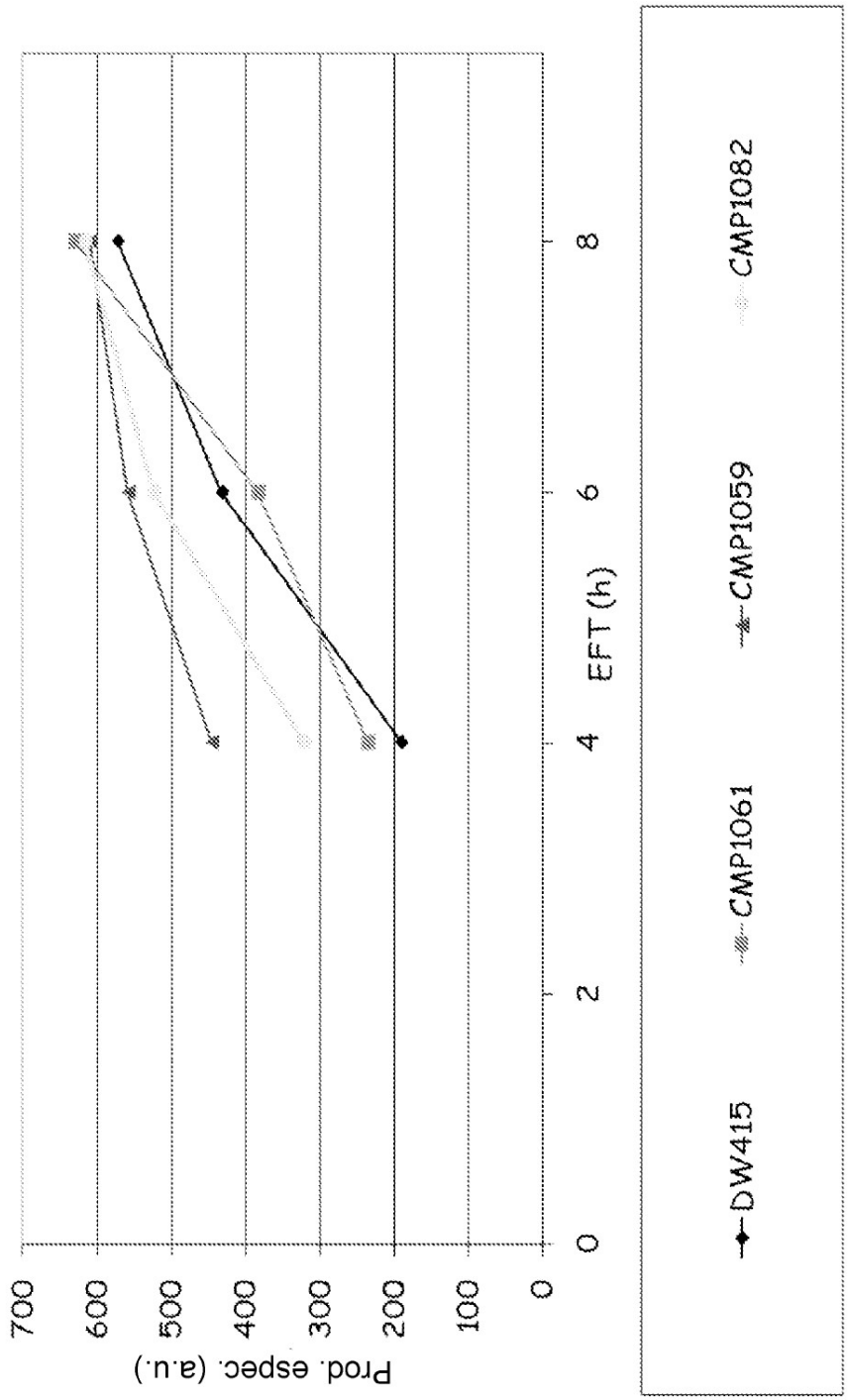

Prod. espec. (a.u.)
700
600
500
400
300
200
100
0
0
2
4
6
8
EFT (h)
DW415
CMP1061
CMP1059
CMP1082

Figura 7b

atggactttccgcaacaattggaggcgtgcgtaaagcaagcaaatcaagccctgtctcgctttat
tgcgccacttccgtttcaaaacacgcctgtggtcgaaaccatgcaatacggggctctcctgggag
ggaagcggttgagaccattcttagtgtacgctaccggtcatatgtttggcgtaagtaccaacactc
tggatgcgcctgctgctgccgtggaatgcatccatgcgtacagtttaattcatgacgatctgcctg
cgatggatgatgatgatctgcgtagaggcttacctacatgtcacgtaaaatttggcgaagctaac
gcaatacttgcgggcgatgctctccagacgctggctttctctatcctgtctgatgcggatatgccc
gaagtgagcgaccgggatcggattagtatgatttcagaattagcctctgcgagtggaattgcagg
catgtgcgggggacaagcactggatttggatgcagagggcaaacatgtaccattagatgcattg
gaacgcatacatcggcacaaaaccggggctttaattagagctgccgttcggttaggagccttgtc
tgccggtgataaagggcgtcgtgcgttgcctgtattagataaatatgccgagagtatcggtctgg
cttttcaagtgcaggacgatatcctggatgtcgtaggagataccgcaacactgggtaaacgcca
gggtgcagatcaacagctgggtaaatccacatacccagctcttcttggtctggaacaagcccgta
aaaaggcaagagacctgatcgacgacgcgcgccagtccctgaaacagttagcggaacagtctt
tggatactagtgctttagaggccttggcagattatattatacagcgtaataagtaa

Figura 8

gcgcccaatacgcaaaccgcctctccccgcgcgttggccgattcattaatgcagctggcacgacaggtttcccgactggaaagcgggcagtgagcgcaacgcaattaatgtgagttagctcactcattaggcaccccag
gctttacactttatgcttccggctcgtatgttgtgtggaattgtgagcggccagcccctcagcatggactttccgcaacaattggaggcgtgcgtaaagcaagcaaatcaagccctgtctcgctttattgcgccacttccgttt
caaaacacgcctgtggtcgaaaccatgcaatacggggctctcctgggagggaagcggttgagaccattcttagtgtacgctaccggtcatatgtttggcgtaagtaccaacactctggatgcgcctgctgctgccgtgga
atgcatccatgcgtacagtttaattcatgacgatctgcctgcgatggatgatgatgatctgcgtagaggcttacctacatgtcacgtaaaatttggcgaagctaacgcaatacttgcgggcgatgctctccagacgctggct
ttctctatcctgtctgatgcggatatgcccgaagtgagcgaccgggatcggattagtatgatttcagaattagcctctgcgagtggaattgcaggcatgtgcgggggacaagcactggatttggatgcagagggcaaaca
tgtaccattagatgcattggaacgcatacatcggcacaaaaccggggctttaattagagctgccgttcggttaggagccttgtctgccggtgataaagggcgtcgtgcgttgcctgtattagataaatatgccgagagtat
cggtctggcttttcaagtgcaggacgatatcctggatgtcgtaggagataccgcaacactgggtaaacgccagggtgcagatcaacagctgggtaaatccacatacccagctcttcttggtctggaacaagcccgtaaaa
aggcaagagacctgatcgacgacgcgcgccagtccctgaaacagttagcggaacagtctttggatactagtgctttagaggccttggcagattatattatacagcgtaataagtaagctgaggggctggcaagtgtagc
ggtcacgctgcgcgtaaccaccacacccgccgcgcttaatgcgccgctacagggcgcgtcaggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaacccctatttgtttatttttctaaatacattcaaatatgtatccgctcatg
agacaataaccctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagagtatgagtattcaacatttccgtgtcgcccttattcccttttttgcggcattttgccttcctgtttttgctcacccagaaacgctggtgaaagtaaaa
gatgctgaagatcagttgggtgcacgagtgggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagttttcgccccgaagaacgttttccaatgatgagcacttttaaagttctgctatgtggcgcggtattat
cccgtattgacgccgggcaagagcaactcggtcgccgcatacactattctcagaatgacttggttgagtactcaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgctgccataacc
atgagtgataacactgcggccaacttacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgcttttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaa
acgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaaactattaactggcgaactacttactctagcttcccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaagttgcaggaccacttct
gcgctcggcccttccggctggctggtttattgctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcactggggccagatggtaagccctcccgtatcgtagttatctacacgacggggagtcaggc
aactatggatgaacgaaatagacagatcgctgagataggtgcctcactgattaagcattggtaactgtcagaccaagtttactcatatatactttagattgatttaaaacttcatttttaatttaaaaggatctaggtgaag
atccttttgataatctcatgaacaataaaactgtctgcttacataaacagtaatacaaggggtgttatgagccatattcaacgggaaacgtcttgctctaggccgcgattaaattccaacatggatgctgatttatatgggt
ataaatgggctcgcgataatgtcgggcaatcaggtgcgacaatctatcgattgtatgggaagcccgatgcgccagagttgtttctgaaacatggcaaaggtagcgttgccaatgatgttacagatgagatggtcagacta
aactggctgacggaatttatgcctcttccgaccatcaagcattttatccgtactcctgatgatgcatggttactcaccactgcgatcccccgggaaaacagcattccaggtattagaagaatatcctgattcaggtgaaaata
ttgttgatgcgctggcagtgttcctgcgccggttgcattcgattcctgtttgtaattgtccttttaacagcgatcgcgtatttcgtctcgctcaggcgcaatcacgaatgaataacggtttggttgatgcgagtgattttgatgac
gagcgtaatggctggcctgttgaacaagtctggaaagaaatgcataaacttttgccattctcaccggattcagtcgtcactcatggtgatttctcacttgataaccttatttttgacgaggggaaattaataggttgtattgat
gttggacgagtcggaatcgcagaccgataccaggatcttgccatcctatggaactgcctcggtgagttttctccttcattacagaaacggctttttcaaaaatatggtattgataatcctgatatgaataaattgcagtttca
tttgatgctcgatgagtttttctaagaattaattcatgaccaaaatcccttaacgtgagttttcgttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatcctttttttctgcgcgtaatctgctgctt
gcaaacaaaaaaaccaccgctaccagcggtggtttgtttgccggatcaagagctaccaactctttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaaatactgtccttctagtgtagccgtagttaggccacc
acttcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgctctgctaatcctgttaccagtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttggactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggtcgggct
gaacgggggttcgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcgccacgcttcccgaagggagaaaggcggacaggtatccggtaagcggcag
ggtcggaacaggagagcgcacgagggagcttccagggggaaacgcctggtatctttatagtcctgtcgggtttcgccacctctgacttgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcaggggggcggagcctatggaaaaacg
ccagcaacgcggccttttacggttcctggccttttgctggccttttgctcacatgttctttcctgcgttatcccctgattctgtggataaccgtattaccgcctttgagtgagctgataccgctcgccgcagccgaacgaccga
gcgcagcgagtcagtgagcgaggaagcggaaga

Figura 9

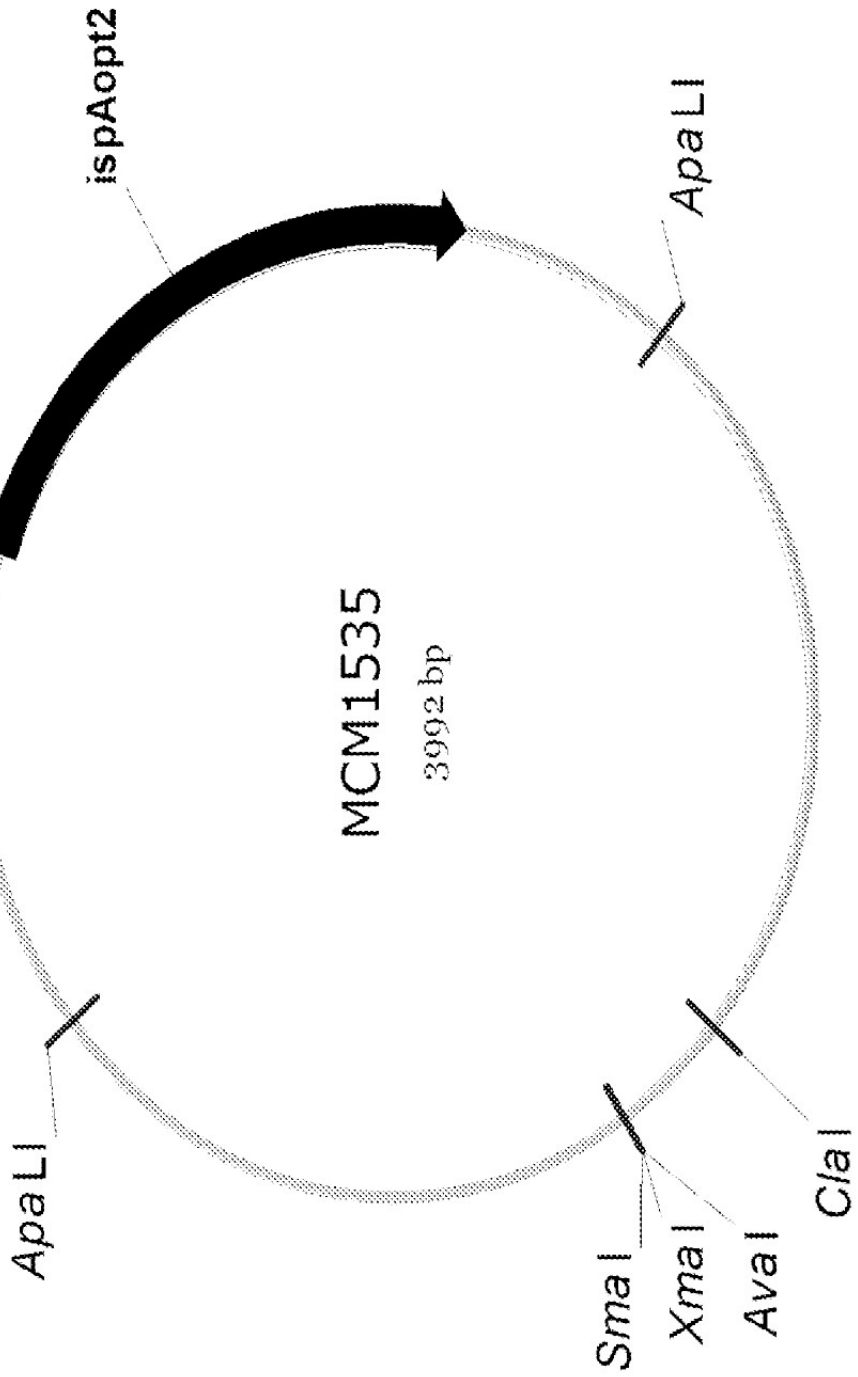


Figura 10

atgcataaatttactggtgtcaatgccaagtttcagcaacccgcgttgaggaacctcagccccgtggtggttgag
agggagagggaggagttcgtggggttcttcccgcagatcgtccgcgatctgaccgaggacggcatcggacacc
cggaggtgggcgacgctgtggcgcggctgaaggaggtgctgcaatacaacgctcccggtgggaaatgcaacc
gtgggctgacggtggtggctgcgtaccgggagctgtcggggccggggcagaaggatgctgagagcctgcggt
gcgcgctggccgtgggttggtgcatcgagttgttccaggccttcttcctggtgtgggatgacatcatggatcagtc
cctcacgcgccgggggcagctgtgttggtataagaaggaggggtcggtttggatgccatcaacgactccttcc
tcctcgagtcctctgtgtacagagtgctgaagaagtactgcaggcagcggccgtattacgtgcatctgttggagc
tcttcctgcagaccgcctaccagactgagctcgggcagatgctggacctcatcacagctcccgtctccaaagtg
gatttgagtcacttcagtgaggagaggtacaaagccatcgttaagtacaagactgccttctactccttctaccta
cccgtggctgctgccatgtatatggttgggatcgacagtaaggaagaacacgagaatgccaaagccatcctgc
tggagatgggggaatacttccagatccaggatgattacctggactgctttggggacccggcgctcacggggaa
ggtgggcaccgacatccaggacaataaatgcagctggctcgtggtgcagtgcctgcagcgcgtcacgccgga
gcagcggcagctcctggaggacaactacggccgtaaggagcccgagaaggtggcgaaggtgaaggagctgt
atgaggccgtggggatgagggctgcgttccagcagtacgaggagagcagctaccggcgcctgcaggaactga
tagagaagcactcgaaccgcctcccgaaggagatcttcctcggcctggcacagaagatctacaaacgccaga
aatga

Figura 11

atgcataaatttactggtgtcaatgccaagtttcagcaacccgcgttgaggaacctcagccccgtggtggttga
gagggagagggaggagttcgtggggttcttcccgcagatcgtccgcgatctgaccgaggacggcatcggaca
cccagaggtgggcgacgctgtggcgcggctgaaggaggtgctgcaatacaacgctcccggtgggaaatgca
accgtgggctgacggtggtggctgcgtaccgggagctgtcggggccggggcagaaggatgctgagagcctg
cggtgcgcgctggccgtgggttggtgcatcgagttgttccaggccttcttcctggtggctgatgatatcatggat
cagtccctcacgcgccgggggcagctgtgttggtataagaaggaggggtcggtttggatgccatgtgggact
ccttcctcctggaatcctctgtgtacagagtgctgaagaagtactgcaggcagcggccgtattacgtgcatctg
ttggagctcttcctgcagaccgcctaccagactgagctcgggcagatgctggacctcatcacagctcccgtctc
caaagtggatttgagtcacttcagtgaggagaggtacaaagccatcgttaagtacaagactgccttctactcct
tctacctacccgtggctgctgccatgtatatggttgggatcgacagtaaggaagaacacgagaatgccaaag
ccatcctgctggagatgggggaatacttccagatccaggatgattacctggactgctttggggacccggcgct
cacggggaaggtgggcaccgacatccaggacaataaatgcagctggctcgtggtgcagtgcctgcagcgcg
tcacgccggagcagcggcagctcctggaggacaactacggccgtaaggagcccgagaaggtggcgaaggt
gaaggagctgtatgaggccgtggggatgagggctgcgttccagcagtacgaggagagcagctaccggcgcc
tgcaggaactgatagagaagcactcgaaccgcctcccgaaggagatcttcctcggcctggcacagaagatct
acaaacgccagaaatga

Figura 12

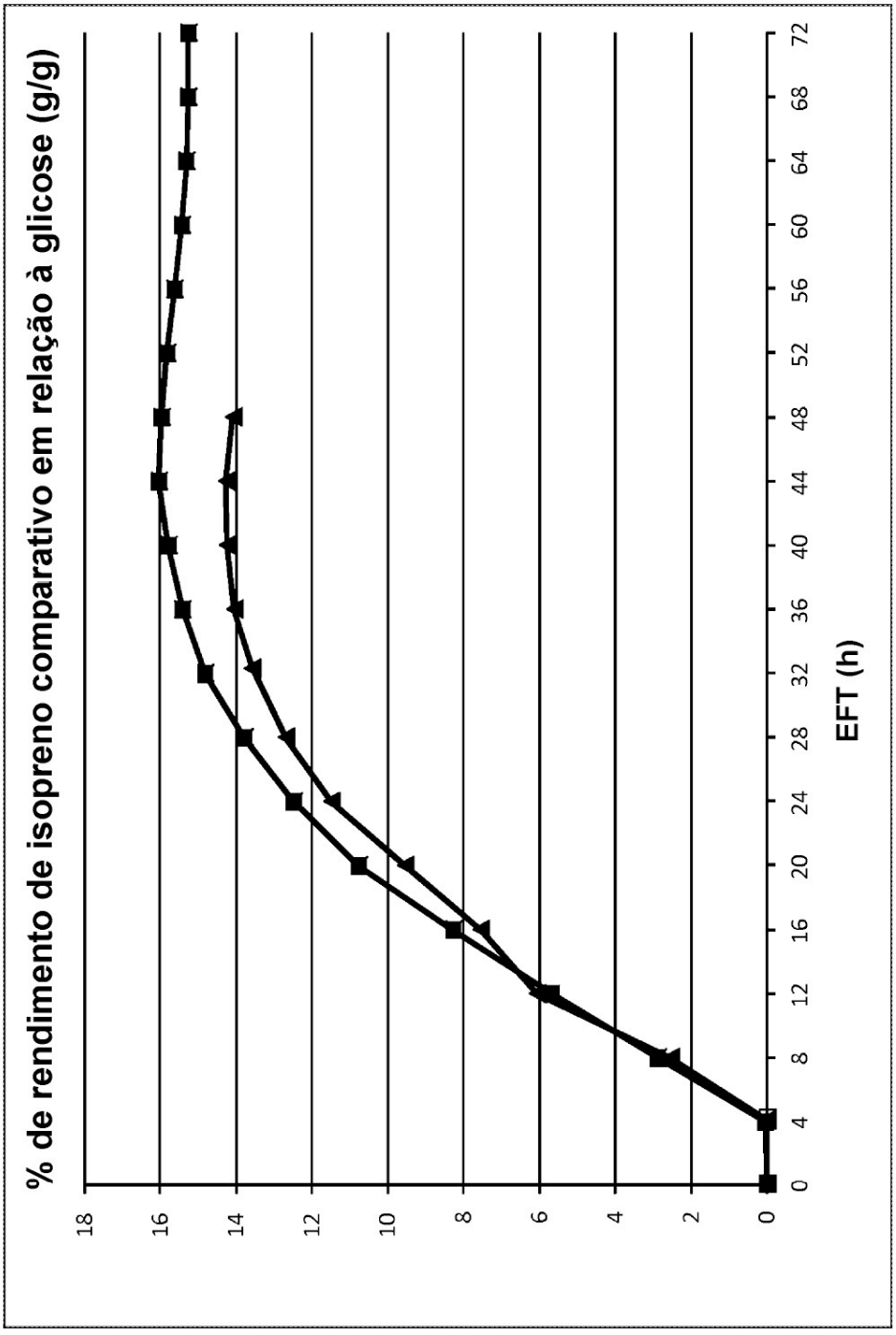

% de rendimento de isopreno comparativo em relação à glicose (g/g)
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
0
4
8
12
16
20
24
28
32
36
40
44
48
52
56
60
64
68
72
EFT (h)

Figura 13

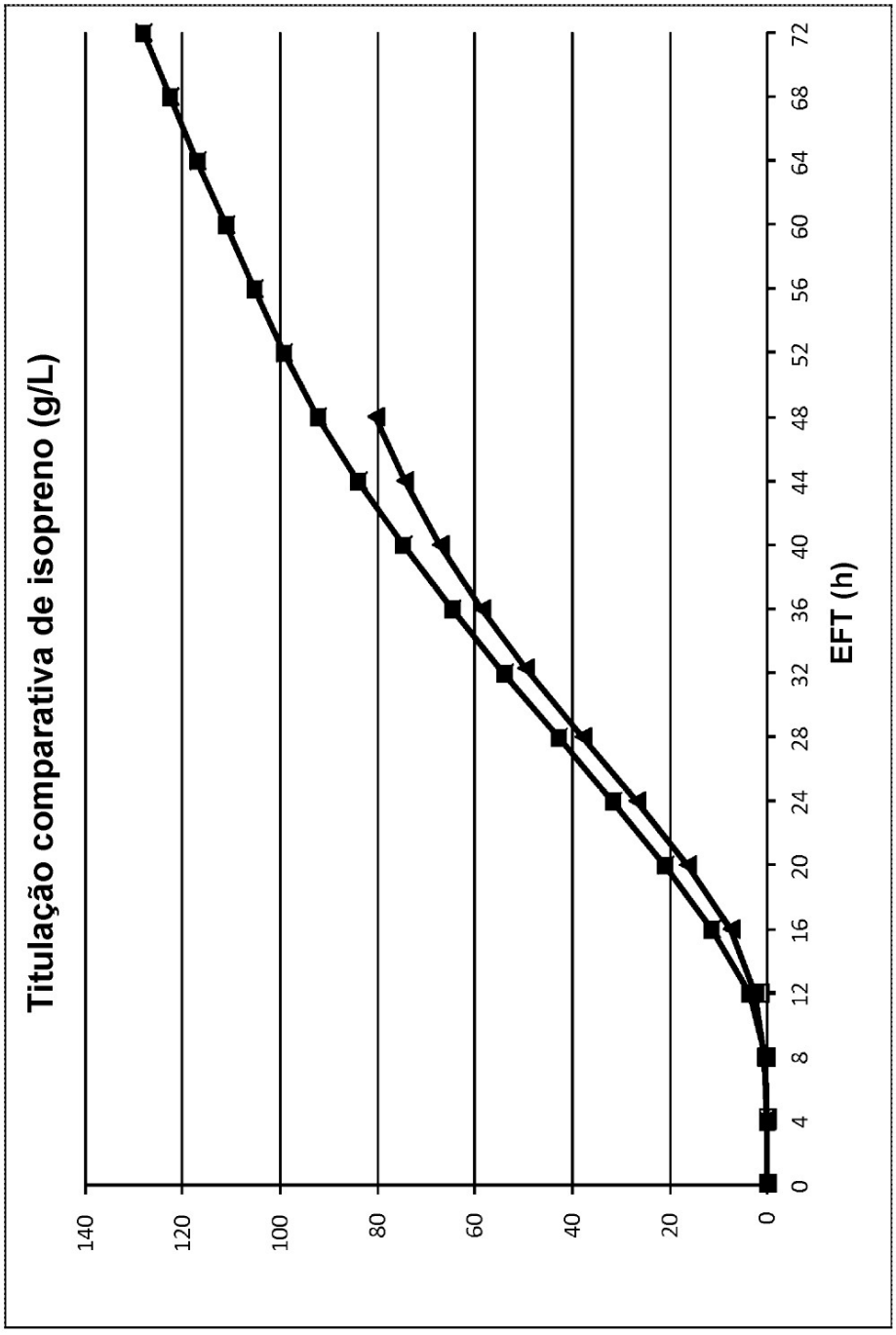

Titulação comparativa de isopreno (g/L)
140
120
100
80
60
40
20
0
0
4
8
12
16
20
24
28
32
36
40
44
48
52
56
60
64
68
72
EFT (h)

Figura 14

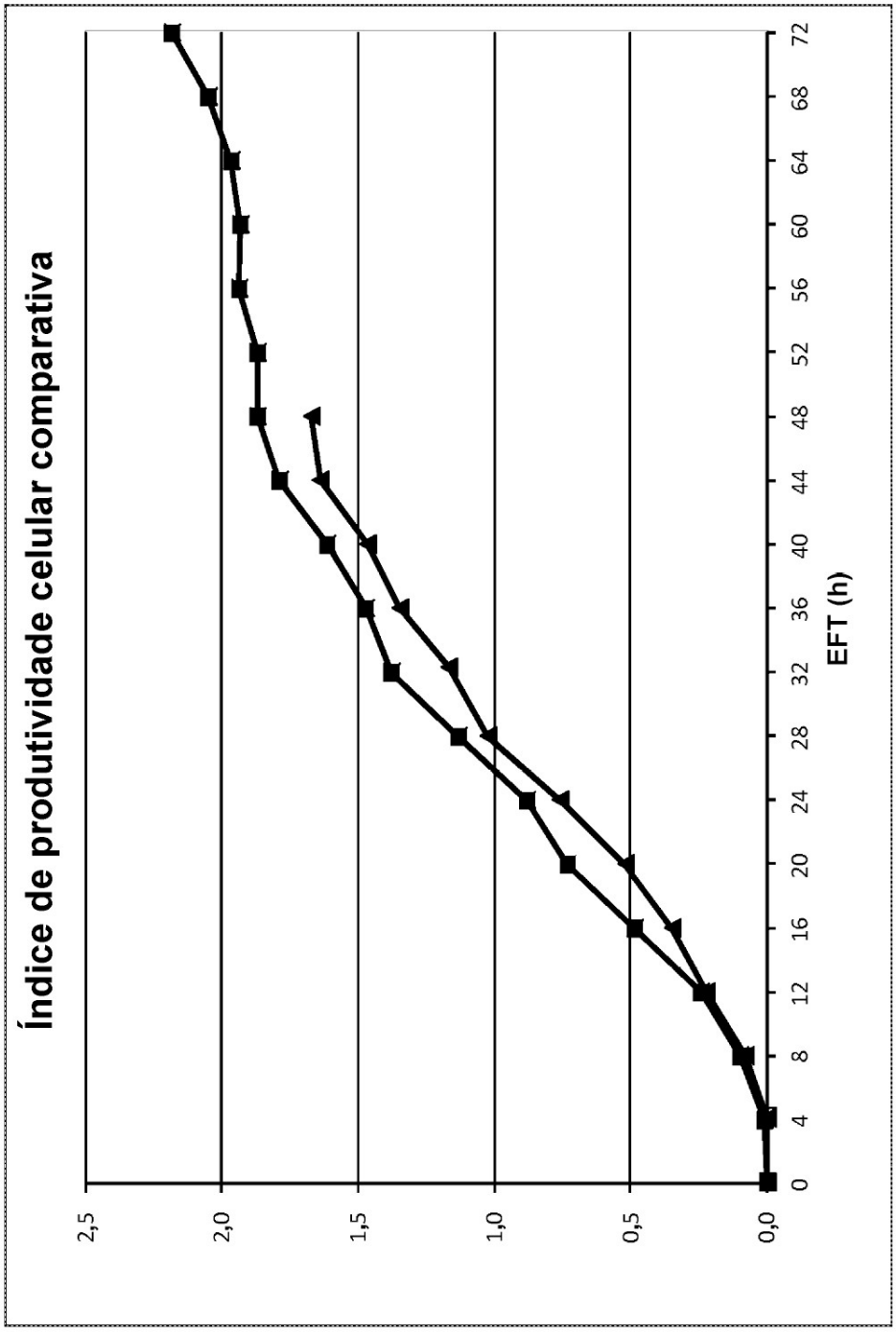

Índice de produtividade celular comparativa
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
0
4
8
12
16
20
24
28
32
36
40
44
48
52
56
60
64
68
72
EFT (h)

Figura 15

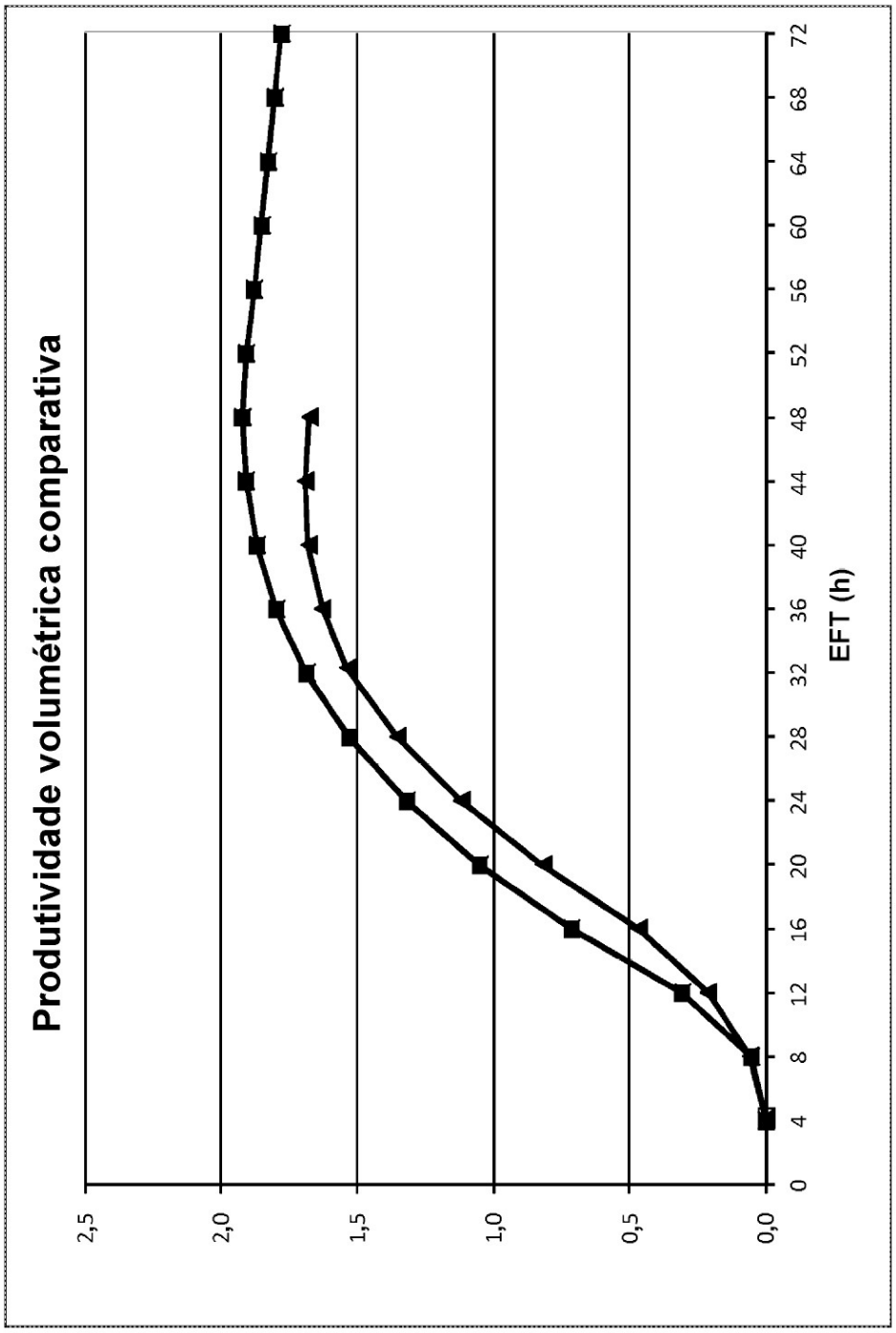

Produtividade volumétrica comparativa
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
0
4
8
12
16
20
24
28
32
36
40
44
48
52
56
60
64
68
72
EFT (h)

Figura 16

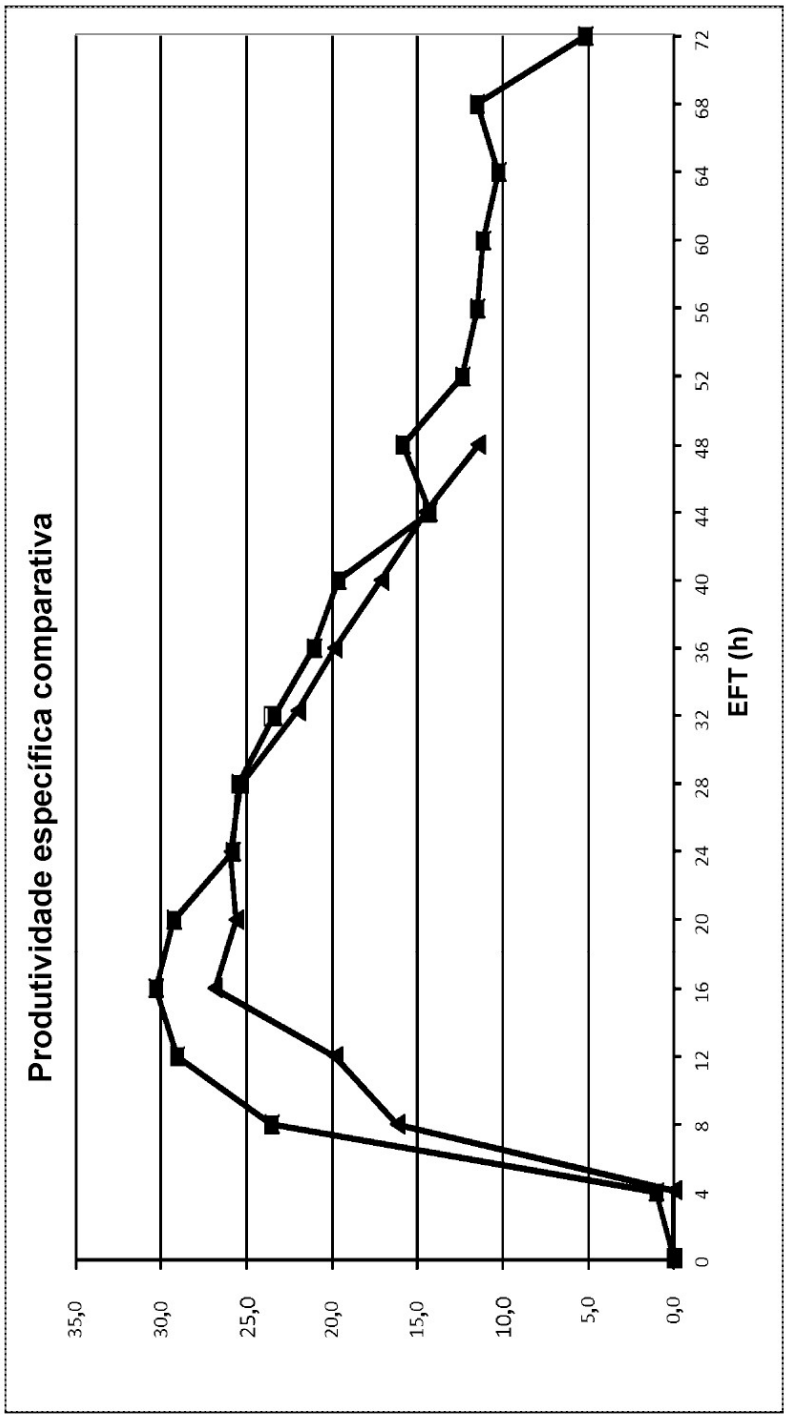

Produtividade específica comparativa
35,0
30,0
25,0
20,0
15,0
10,0
5,0
0,0
0
4
8
12
16
20
24
28
32
36
40
44
48
52
56
60
64
68
72
EFT (h)

Figura 17

Nucleotídeo com otimização de códons para expressão do alelo *hrcA* em *E. coli*:

ATGACTCAACTTTTCCCCGGTCCCATAGTTCGGACGCCAGGACTTGCAGAACTCGATGCGCGGGCTCGCGACA
TATTCAGACGTGTCGTAGAATCTTATCTGGAGACCGGTGAACCAGTGGGCTCTCGCACGATTAGCAAAGGTGG
TGTAGCACTCAGCCCTGCGTCAATCCGCAATACAATGCAGGACTTGGCCCAGTTGGGGTTACTTGACGCACCT
CATACCAGTGCCGGCCGTATGCCGACACACGCTGGTTTAAGAATGTTTGTAGACGGGTTCCTGGAAGTTGGC
GACGTGGCGGAGCAAGAGAAGCGGGCTATTGAAGCACGGCTGGCAGTGAAGGGACGTTCCTTTGAAGAAG
CCCTTGCGGAGGCAAGCTCTATTTTAAGCGGTCTGGCTGGCGGAGCGGGCATTGTCGTCACTCCGGTACGGG
AAGGCGGGGTCAAACATGTTGAGTTTGTGCCGCTGGGAGGTGGTCAGGTTCTGGCTGTGATGGTCTTTGAA
GATGGCCAAGTAGAAAACCGCTTAATGCGCCAGG**C**CCCCGGCGTCACCCCTTCTGCTCTACA**G**GAAGCCTCG
AATTTCTTGAATGCCCGTTTACGTGGACGGACACTCACGGAAGCCCGTACCGAAATGGGAGGTGAACTTGAT
GCGGCTCGCCGCCAGCTTAATGAAACAGCTGCTCGGCTGGTGGAAGATGGACTGGCAGCATGGTCAGGTGG
AGAAGGAGACGCCCGCAGCTTGATCGTTCGCGGACAGGCGAACCTTCTTGCCGATGCTCGTGCACGCGAGG
ATATAGACCGCGTTCGTCAGTTGTTCGATGATTTGAGTCGCCGTGCGCAACTCATCGGGCTCCTCGATGATGTC
CGGGACGCGGAAGGTGTGCGCATTTATATTGGAGCTGAAACCCGCCTGTTCTCACTTTCTGGAAGCTCGGTG
ATCGCTGCCCCGTACATGACAGGCCGTCAAAAGGTATTGGGCGCCATAGGGGTTATCGGACCTGCCCGCTTGA
ATTACGCTCGCGTTATCCCACTCGTGGATTATACGGCACGCGTTTTGGGCCGTATGATGGACGGT***TGA***.

Figura 18

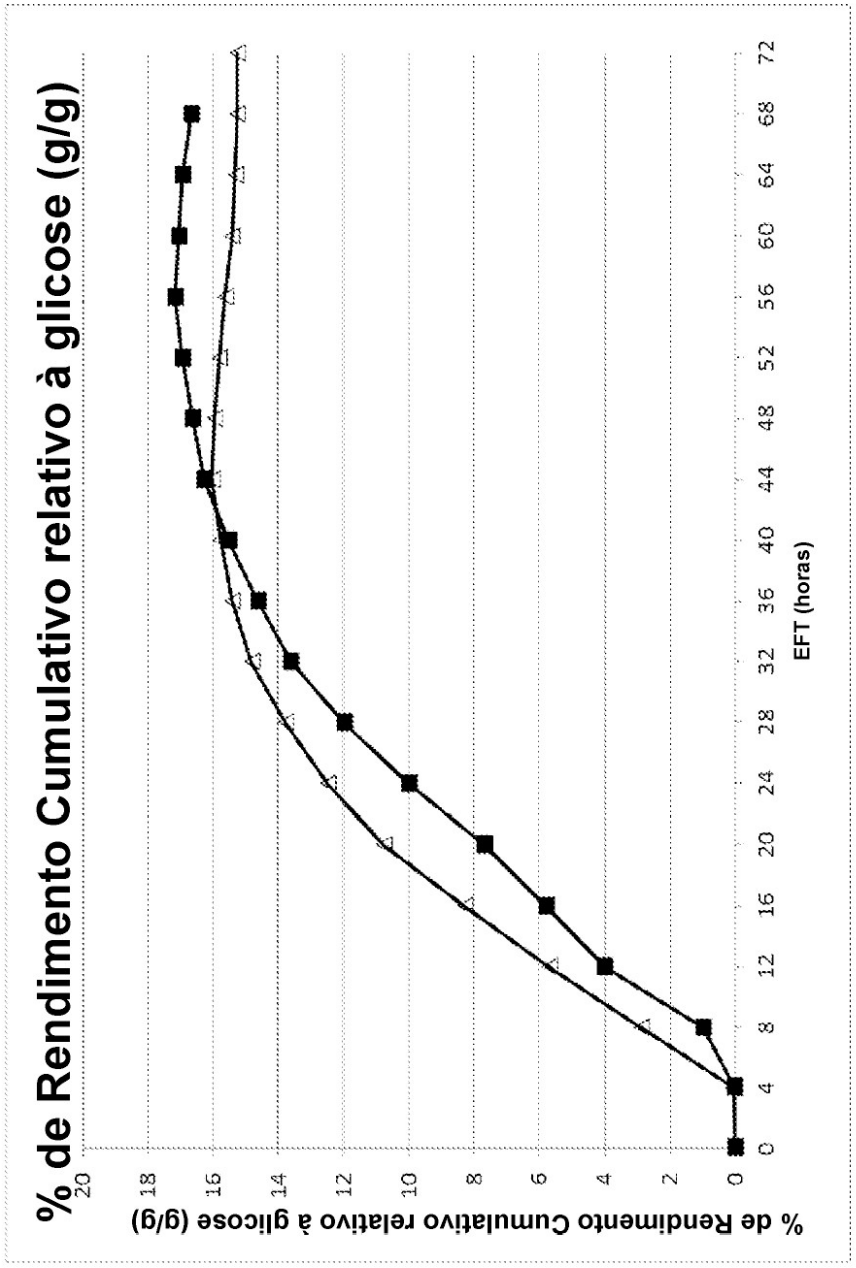

% de Rendimento Cumulativo relativo à glicose (g/g)
% de Rendimento Cumulativo relativo à glicose (g/g)
EFT (horas)
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
0
4
8
12
16
20
24
28
32
36
40
44
48
52
56
60
64
68
72

Figura 19

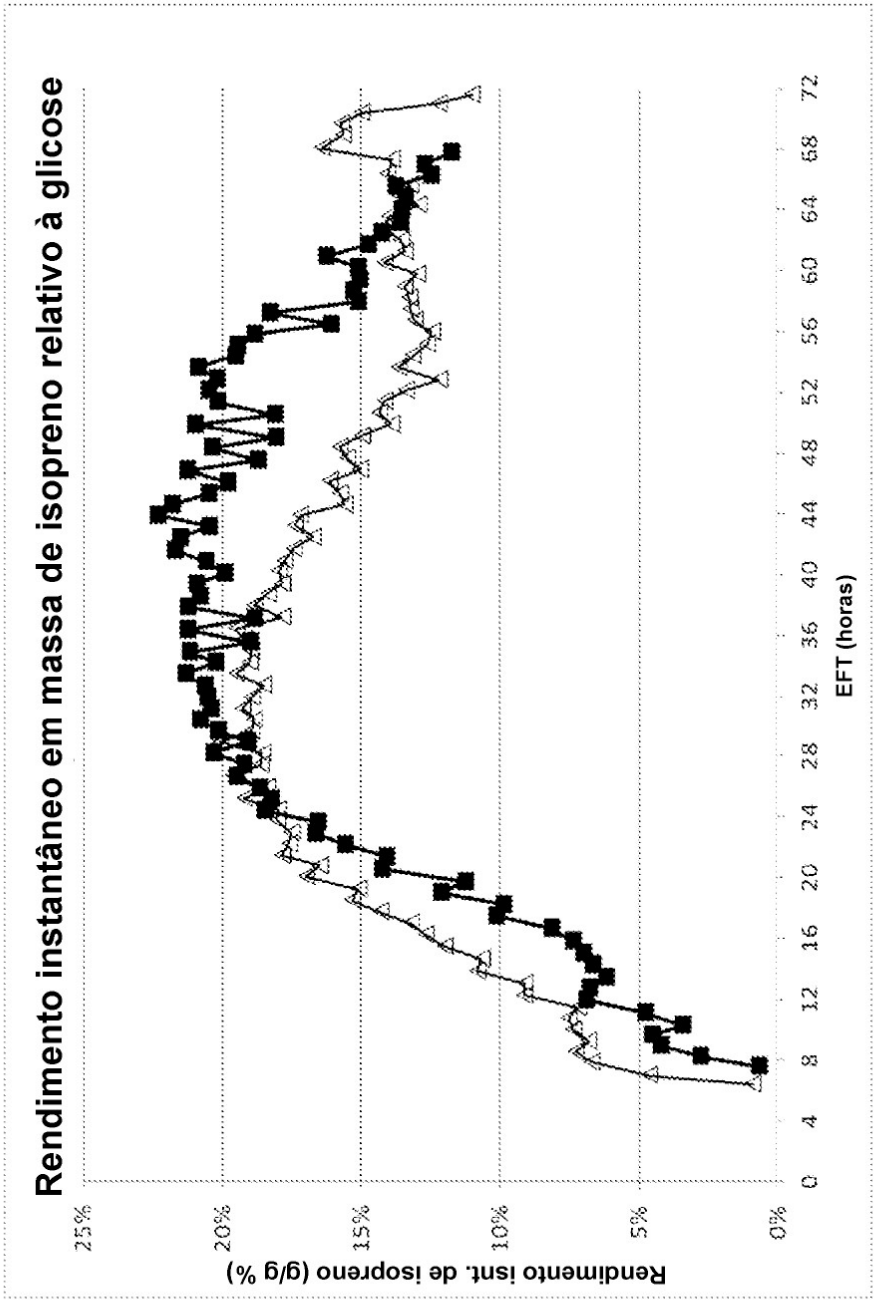

Rendimento instantâneo em massa de isopreno relativo à glicose
Rendimento inst. de isopreno (g/g %)
25%
20%
15%
10%
5%
0%
0
4
8
12
16
20
24
28
32
36
40
44
48
52
56
60
64
68
72
EFT (horas)

Figura 20

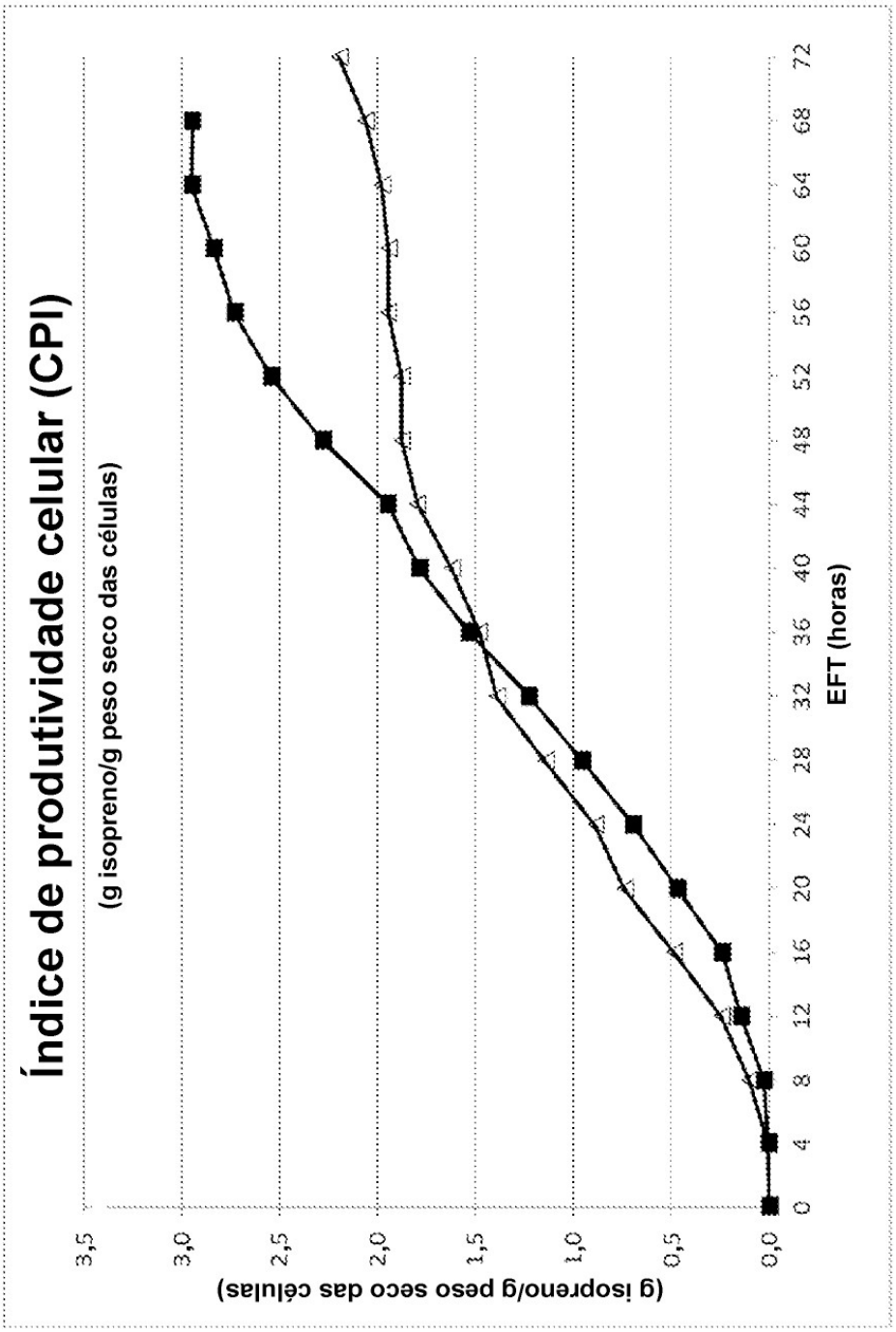

Índice de produtividade celular (CPI)
(g isopreno/g peso seco das células)
(g isopreno/g peso seco das células)
EFT (horas)
0,0
0,5
1,0
1,5
2,0
2,5
3,0
3,5
0
4
8
12
16
20
24
28
32
36
40
44
48
52
56
60
64
68
72

Figura 21

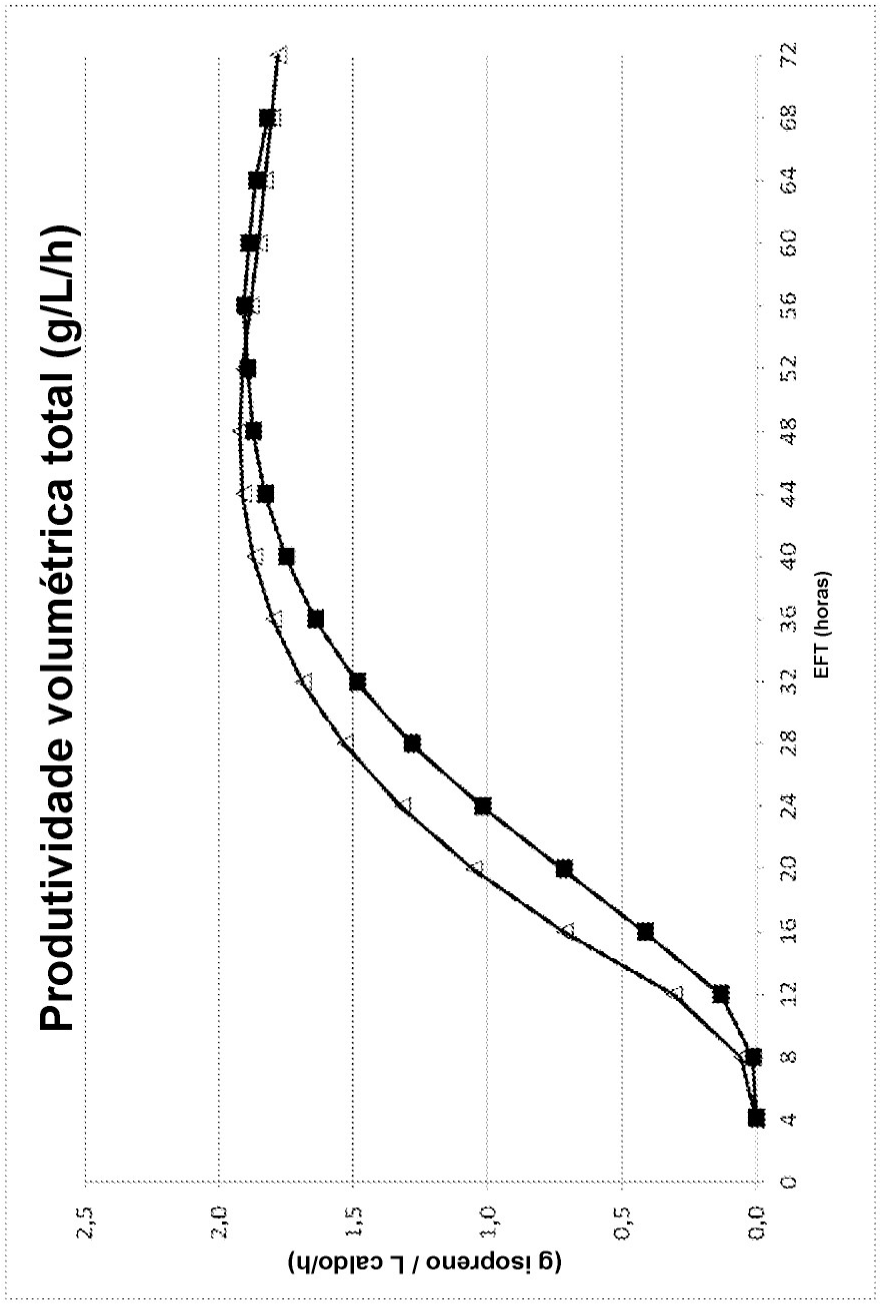

Produtividade volumétrica total (g/L/h)
(g isopreno / L caldo/h)
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
0
4
8
12
16
20
24
28
32
36
40
44
48
52
56
60
64
68
72
EFT (horas)

Figura 22

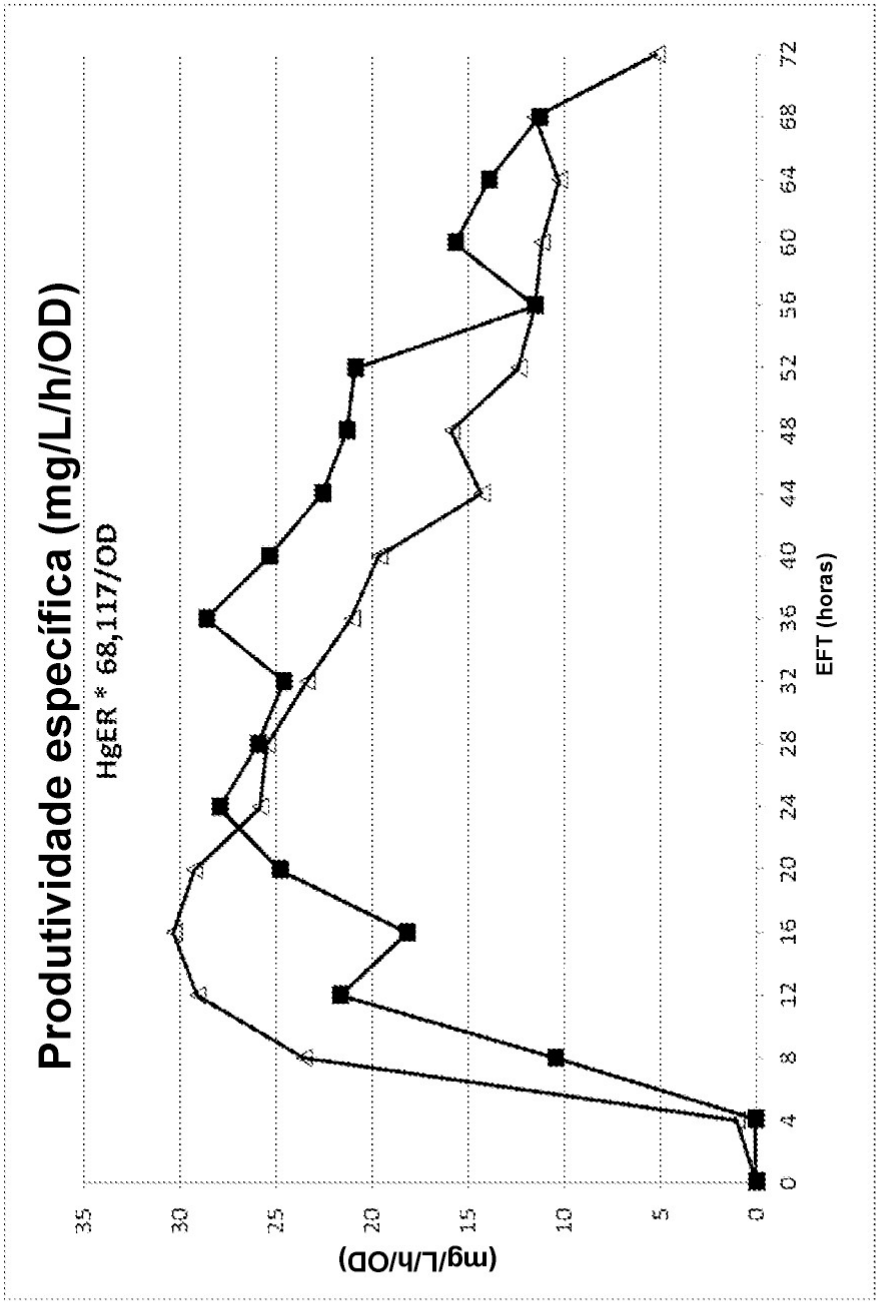

Produtividade específica (mg/L/h/OD)
HgER * 68,117/OD
(mg/L/h/OD)
EFT (horas)
0
5
10
15
20
25
30
35
0
4
8
12
15
20
24
28
32
36
40
44
48
52
56
60
64
68
72

Figura 23

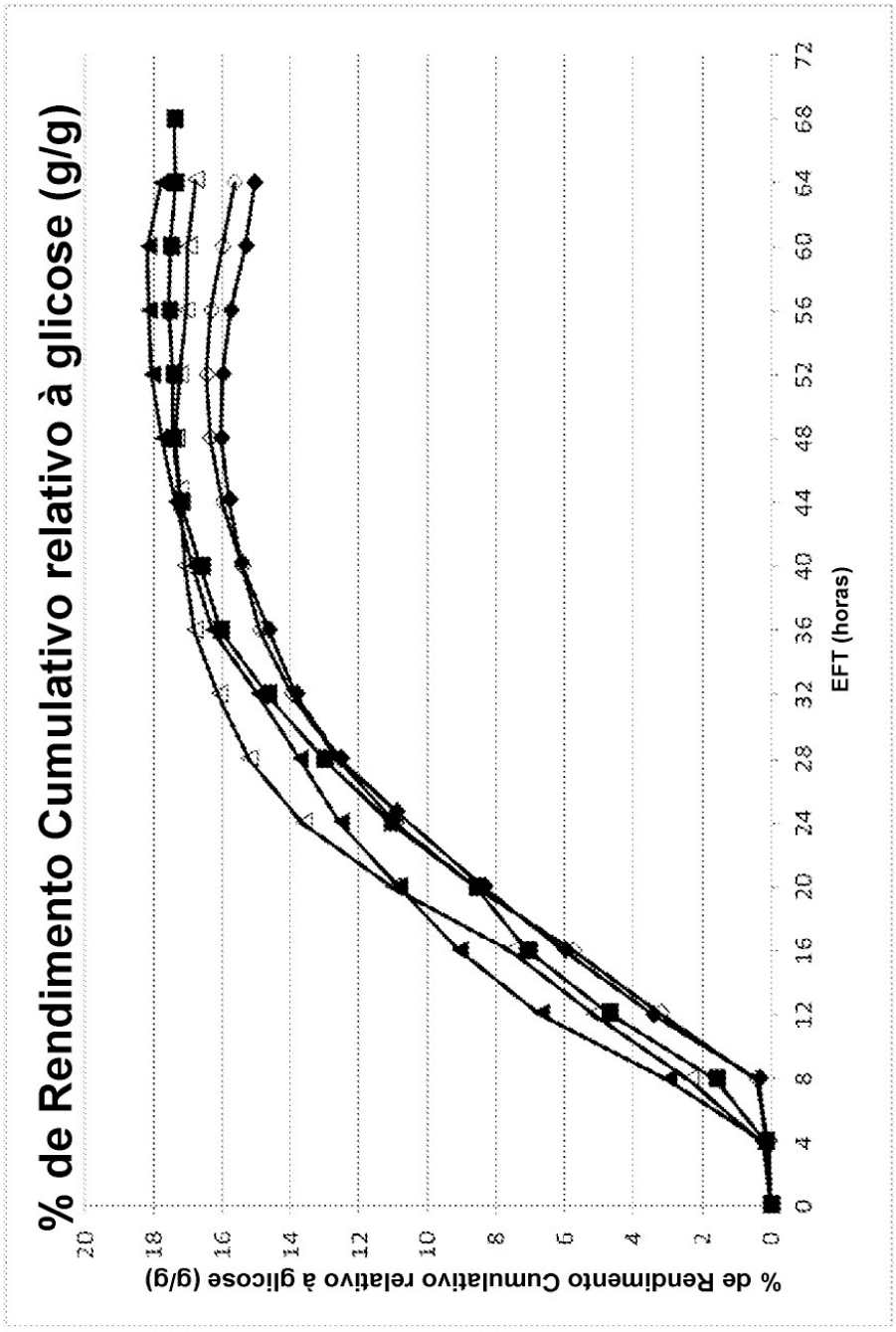

% de Rendimento Cumulativo relativo à glicose (g/g)
% de Rendimento Cumulativo relativo à glicose (g/g)
EFT (horas)
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
0
4
8
12
16
20
24
28
32
36
40
44
48
52
56
60
64
68
72

Figura 24

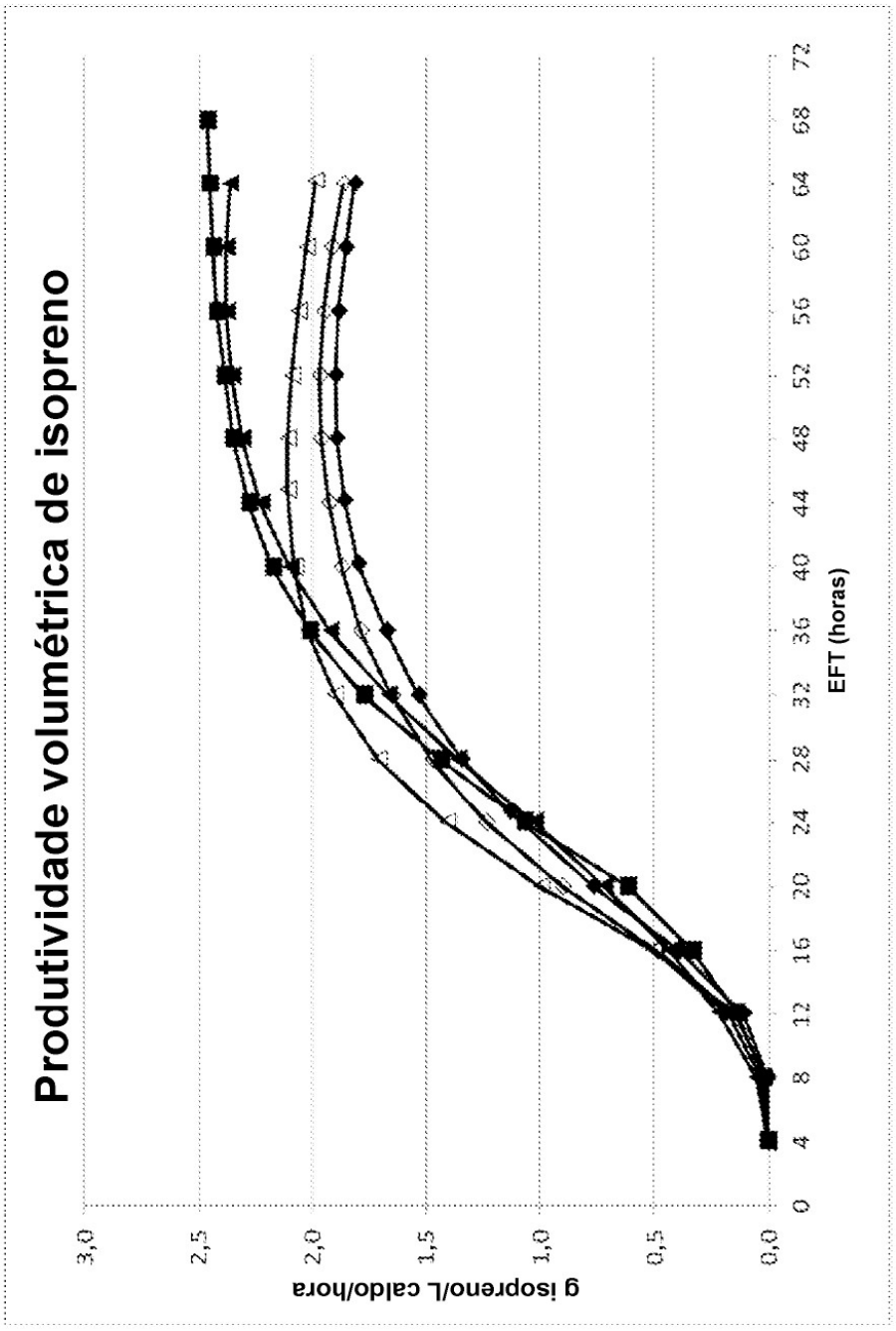

Produtividade volumétrica de isopreno
g isopreno/L caldo/hora
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
0
4
8
12
16
20
24
28
32
36
40
44
48
52
56
60
64
68
72
EFT (horas)

Figura 25

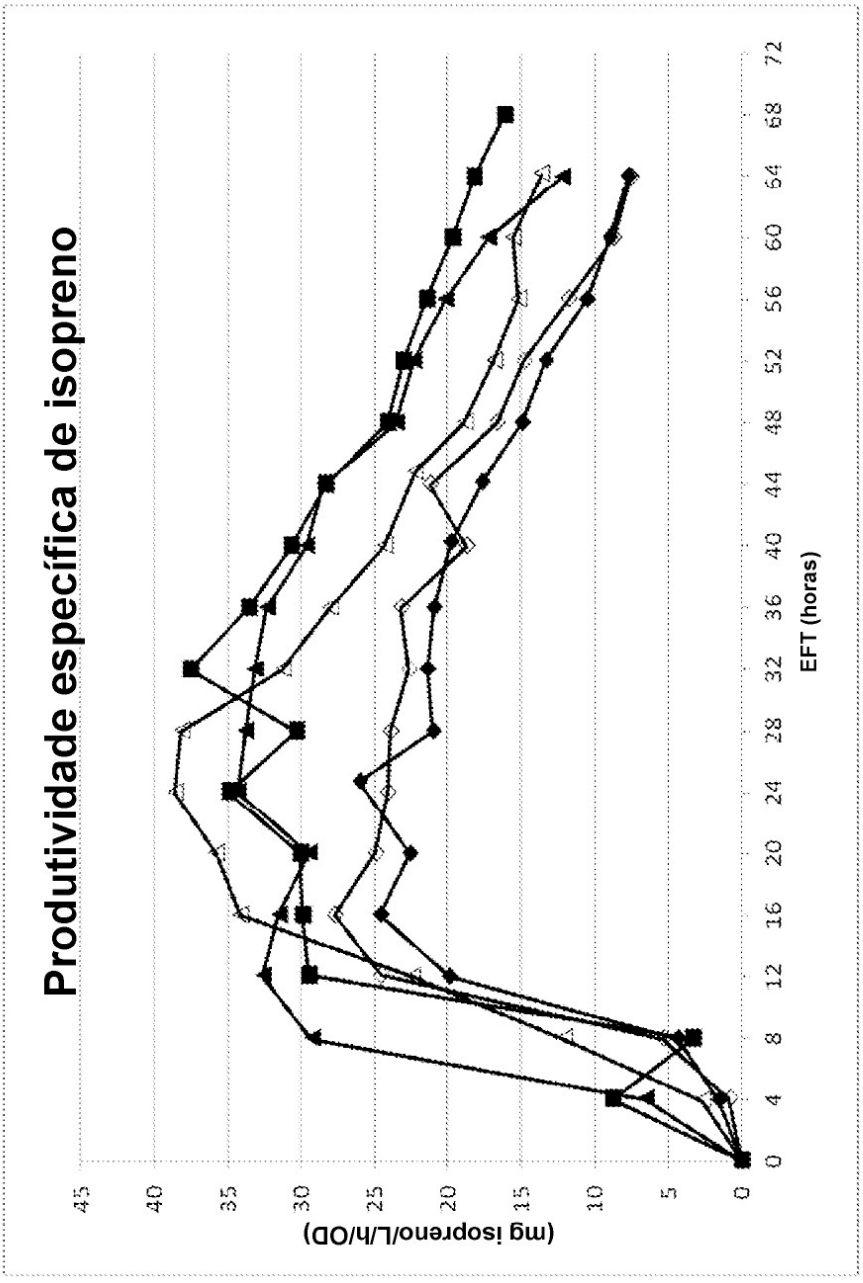

Produtividade específica de isopreno
(mg isopreno/L/h/OD)
EFT (horas)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
0
4
8
12
16
20
24
28
32
36
40
44
48
52
56
60
64
68
72

Figura 26

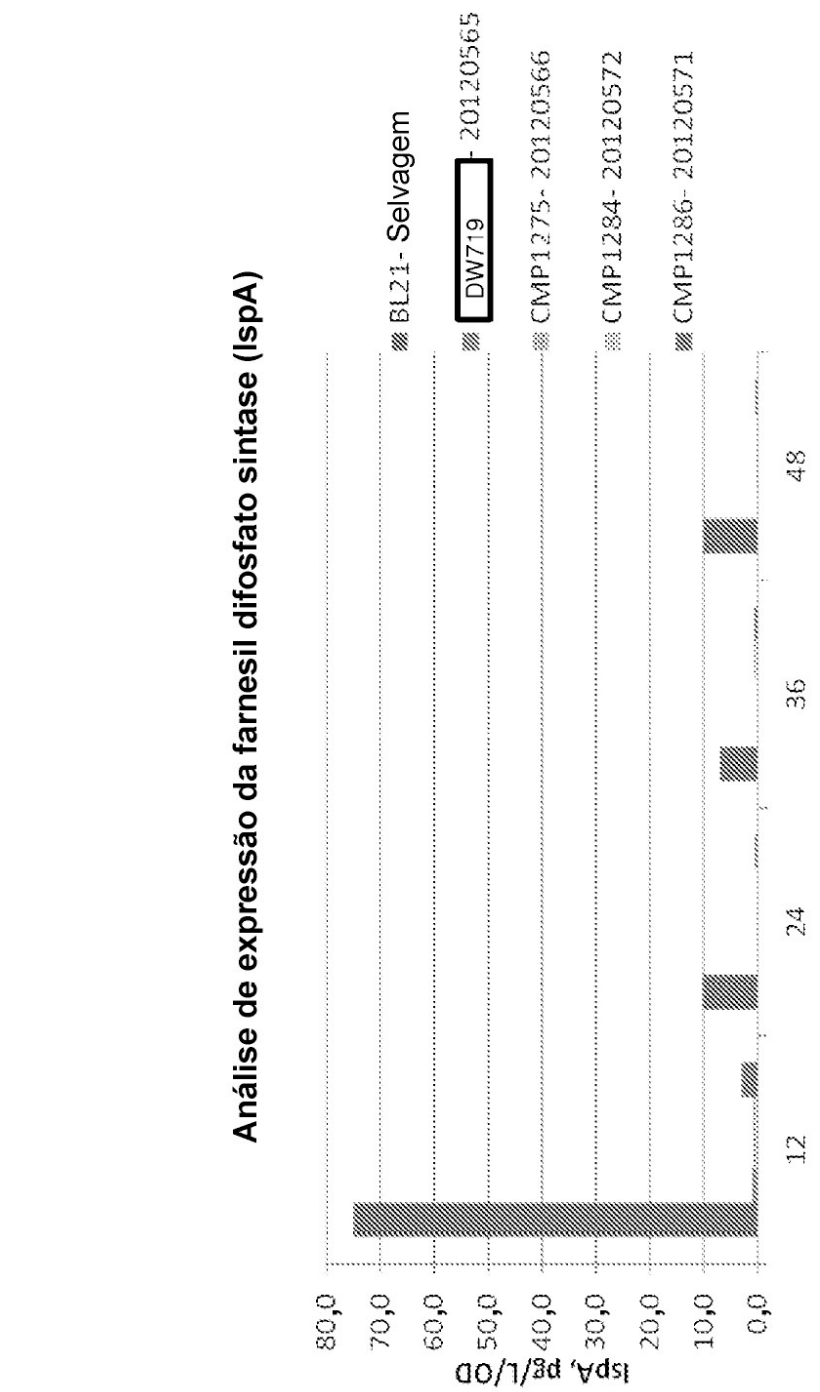

Análise de expressão da farnesil difosfato sintase (IspA)
BL21- Selvagem
DW719 - 20120565
CMP1275- 20120566
CMP1284- 20120572
CMP1286- 20120571
IspA, pg/L/OD
80,0
70,0
60,0
50,0
40,0
30,0
20,0
10,0
0,0
12
24
36
48
Fermentação, horas

Figura 27

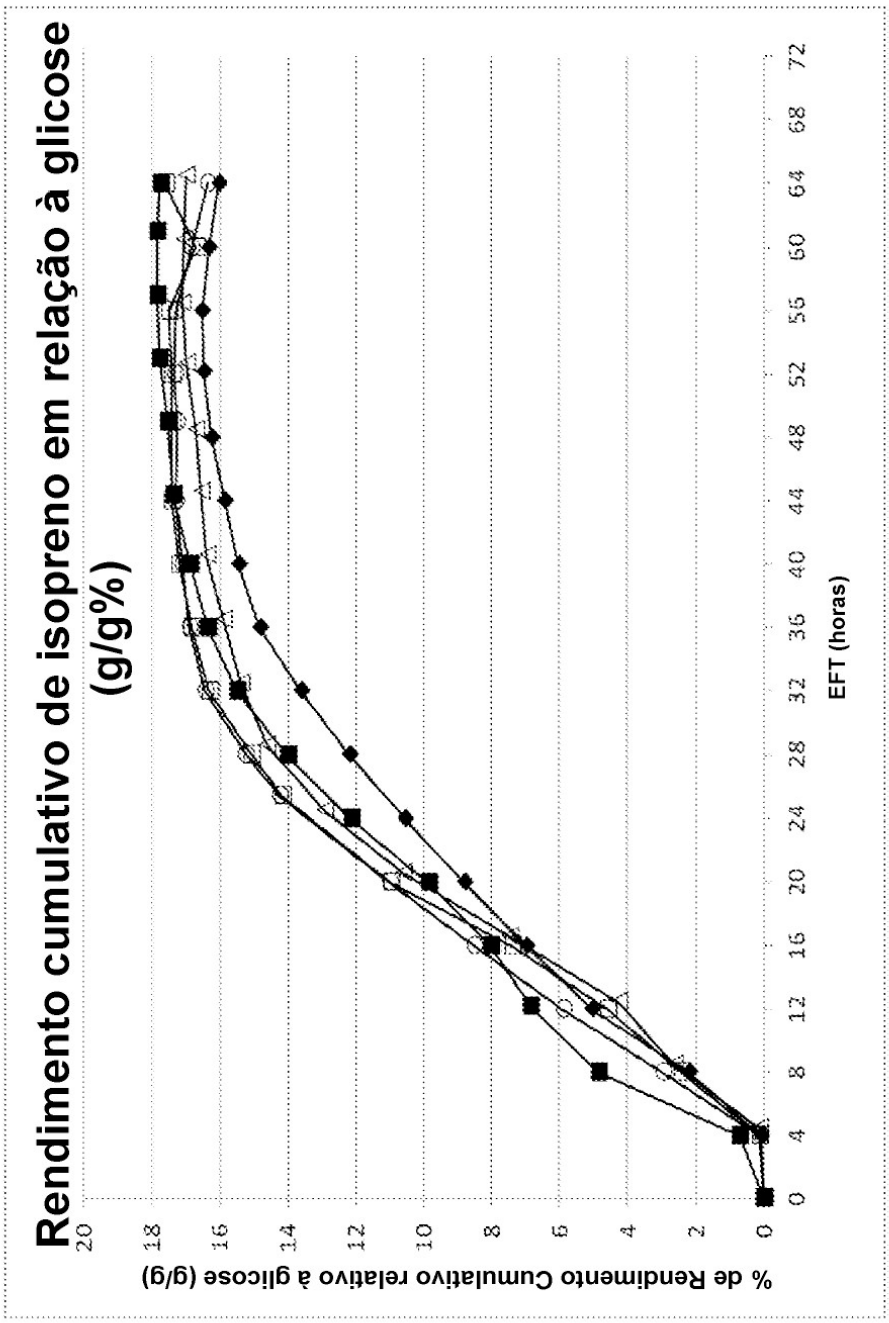

Rendimento cumulativo de isopreno em relação à glicose (g/g%)
% de Rendimento Cumulativo relativo à glicose (g/g)
EFT (horas)
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
0
4
8
12
16
20
24
28
32
36
40
44
48
52
55
60
64
68
72

Figura 28

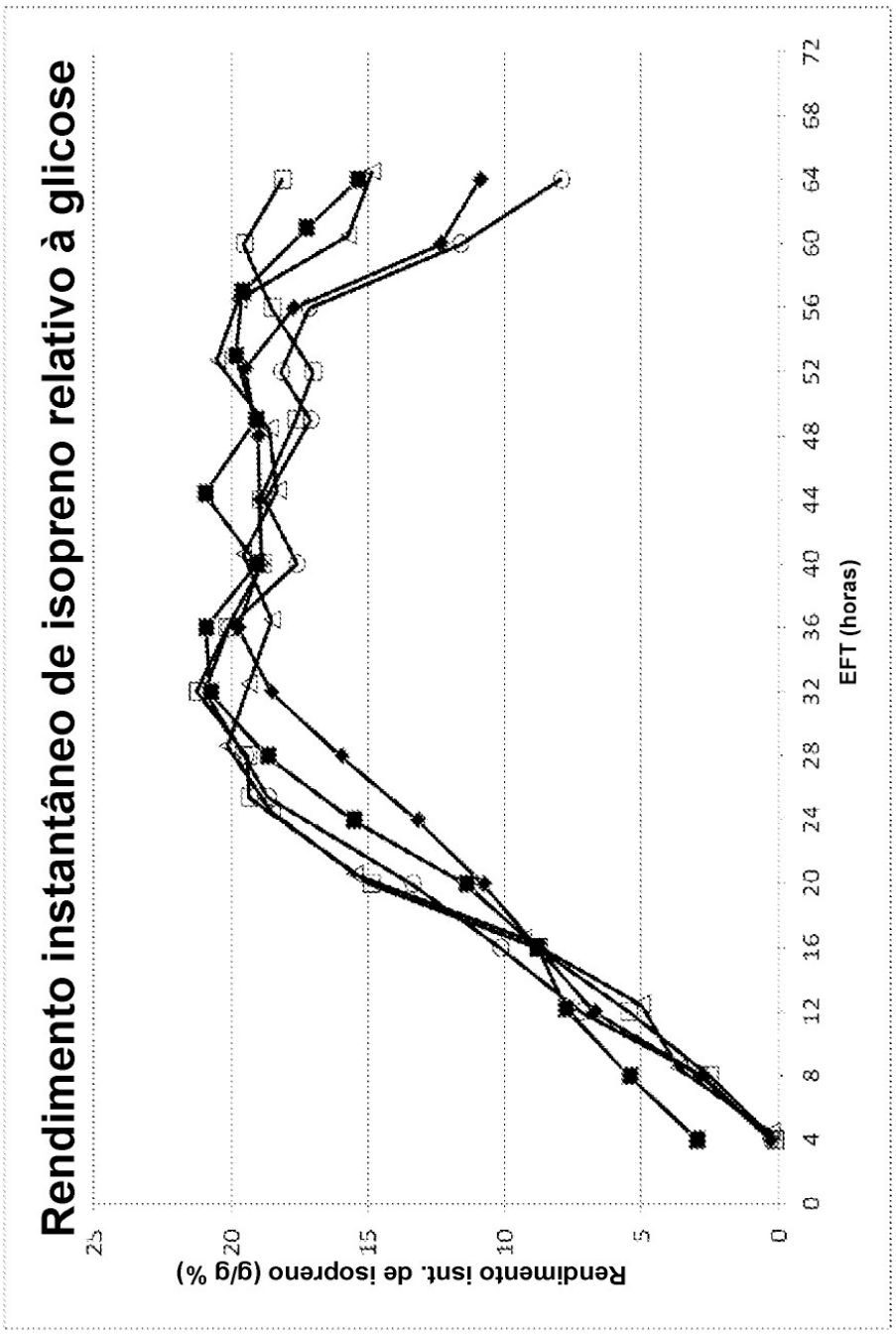

Rendimento instantâneo de isopreno relativo à glicose
Rendimento inst. de isopreno (g/g %)
25
20
15
10
5
0
0
4
8
12
16
20
24
28
32
36
40
44
48
52
56
60
64
68
72
EFT (horas)

Figura 29

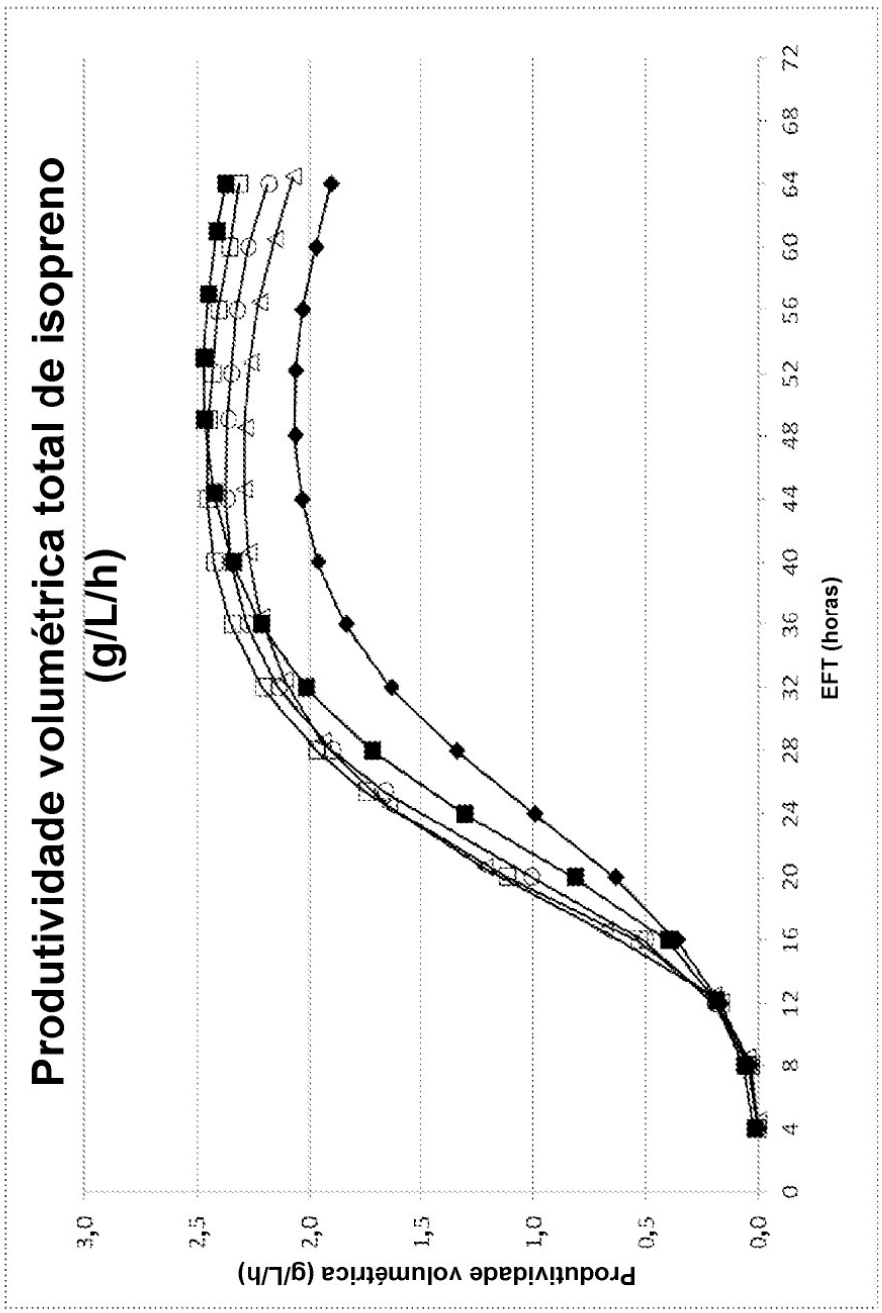

Produtividade volumétrica total de isopreno (g/L/h)
Produtividade volumétrica (g/L/h)
EFT (horas)
0,0
0,5
1,0
1,5
2,0
2,5
3,0
0
4
8
12
16
20
24
28
32
36
40
44
48
52
56
60
64
68
72

Figura 30

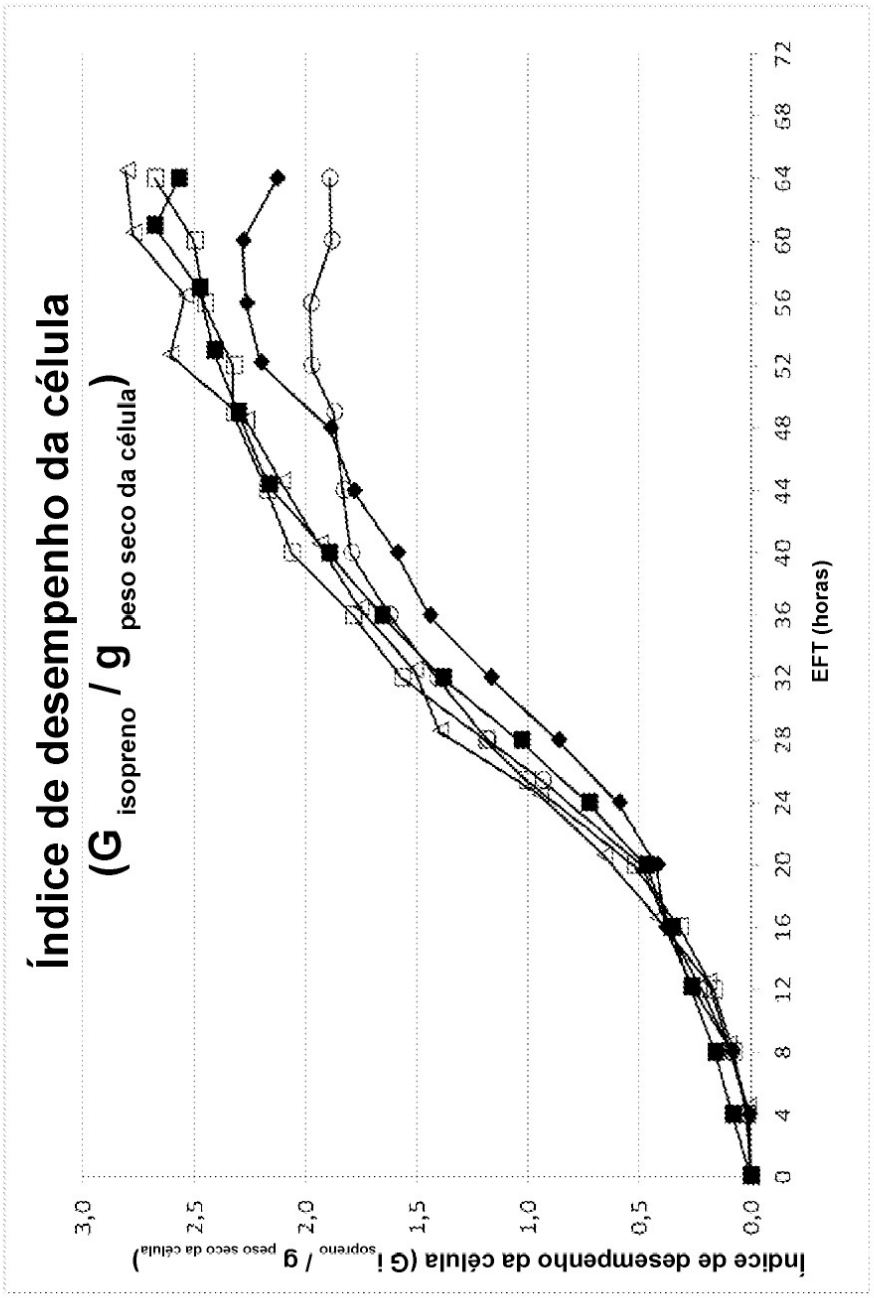

Índice de desempenho da célula
(G isopreno / g peso seco da célula)
Índice de desempenho da célula (G isopreno / g peso seco da célula)
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
0
4
8
12
16
20
24
28
32
36
40
44
48
52
56
60
64
68
72
EFT (horas)

Figura 31

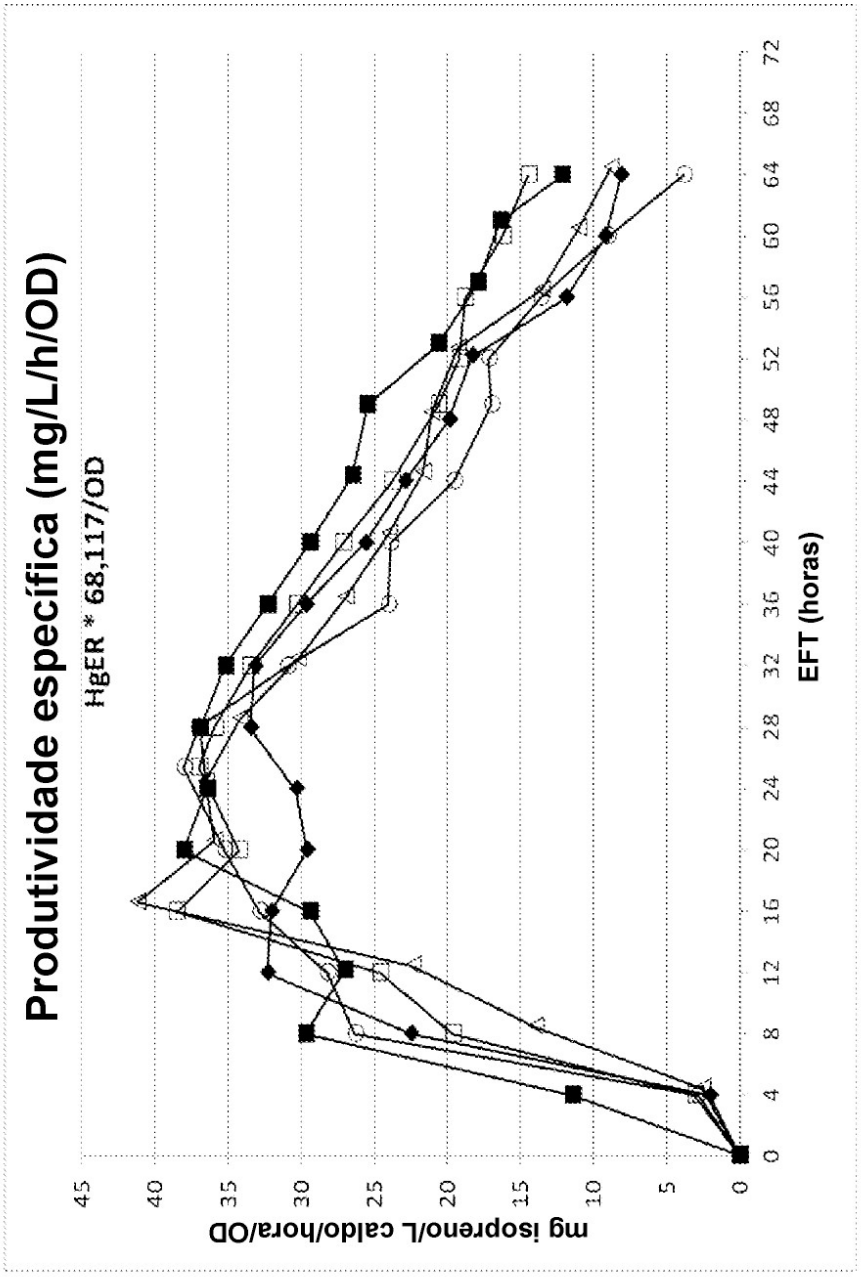

Produtividade específica (mg/L/h/OD)
HgER * 68,117/OD
mg isopreno/L caldo/hora/OD
EFT (horas)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
0
4
8
12
16
20
24
28
32
36
40
44
48
52
56
60
64
68
72

Figura 32

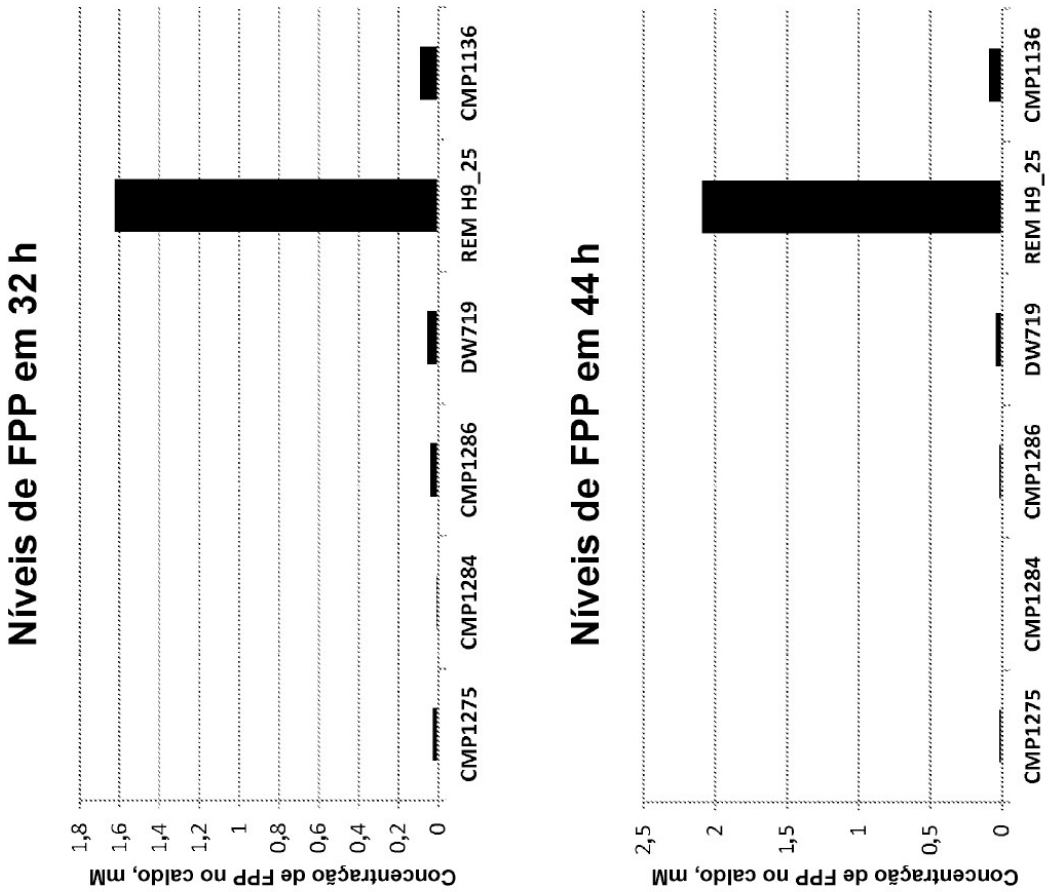

Níveis de FPP em 32 h
Concentração de FPP no caldo, mM
1,8
1,6
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
CMP1275
CMP1284
CMP1286
DW719
REM H9_25
CMP1136
Níveis de FPP em 44 h
Concentração de FPP no caldo, mM
2,5
2
1,5
1
0,5
0
CMP1275
CMP1284
CMP1286
DW719
REM H9_25
CMP1136

Figura 33

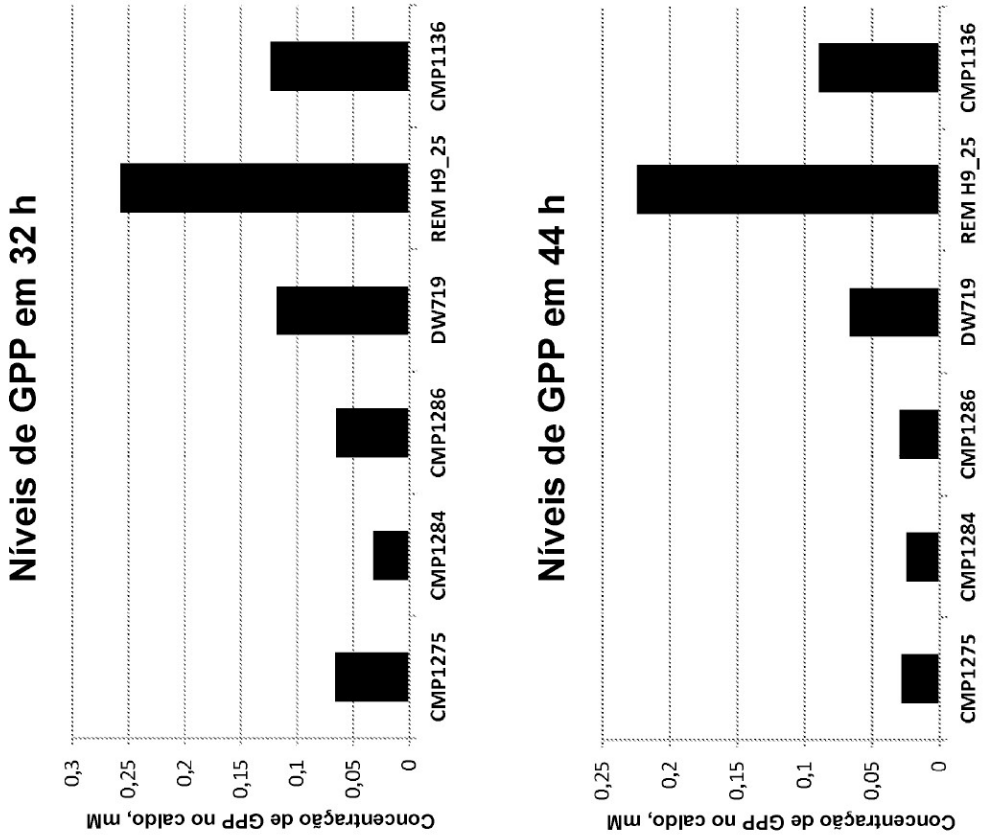
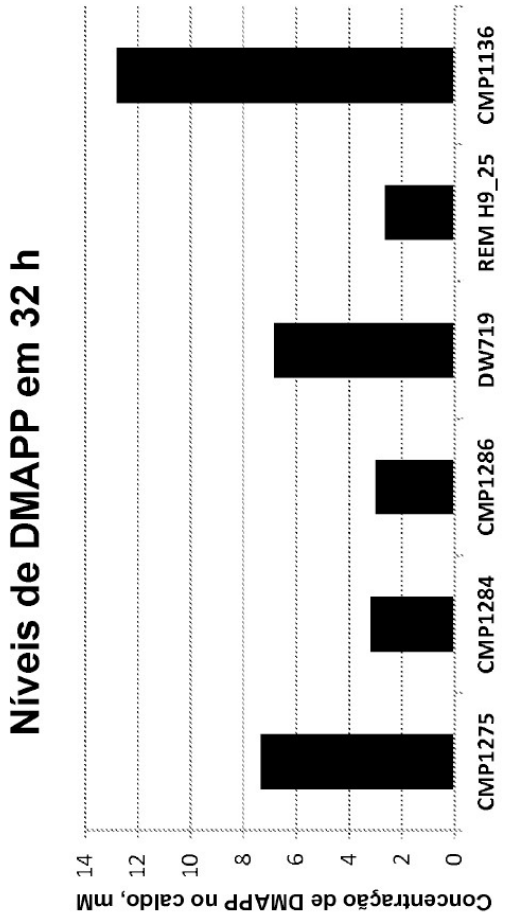

Níveis de GPP em 32 h
Concentração de GPP no caldo, mM
0,3
0,25
0,2
0,15
0,1
0,05
0
CMP1275
CMP1284
CMP1286
DW719
REM H9_25
CMP1136
Níveis de GPP em 44 h
Concentração de GPP no caldo, mM
0,25
0,2
0,15
0,1
0,05
0
CMP1275
CMP1284
CMP1286
DW719
REM H9_25
CMP1136

Figura 34


Níveis de DMAPP em 32 h
Concentração de DMAPP no caldo, mM
0
2
4
6
8
10
12
14
CMP1275
CMP1284
CMP1286
DW719
REM H9_25
CMP1136

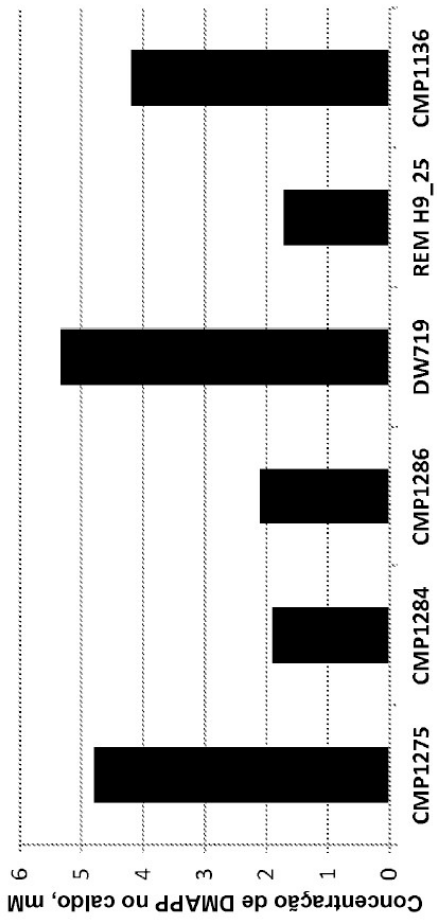
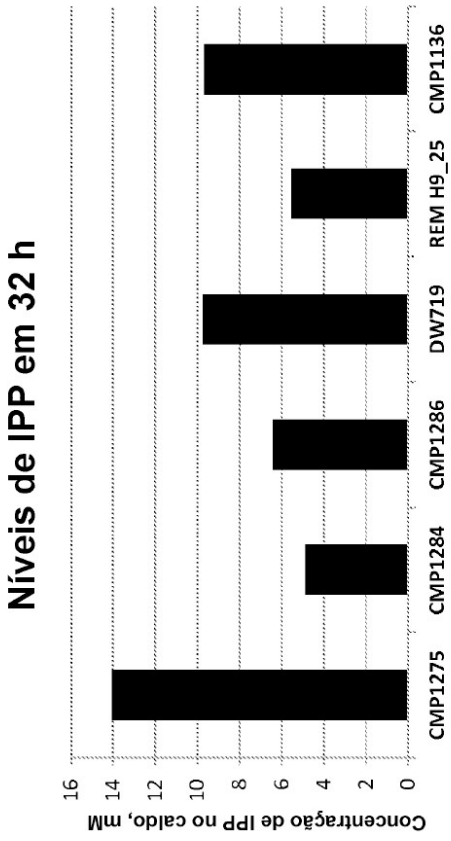

Níveis de DMAPP em 44 h
Concentração de DMAPP no caldo, mM
0
1
2
3
4
5
6
CMP1275
CMP1284
CMP1286
DW719
REM H9_25
CMP1136

Figura 35


Níveis de IPP em 32 h
Concentração de IPP no caldo, mM
0
2
4
6
8
10
12
14
16
CMP1275
CMP1284
CMP1286
DW719
REM H9_25
CMP1136

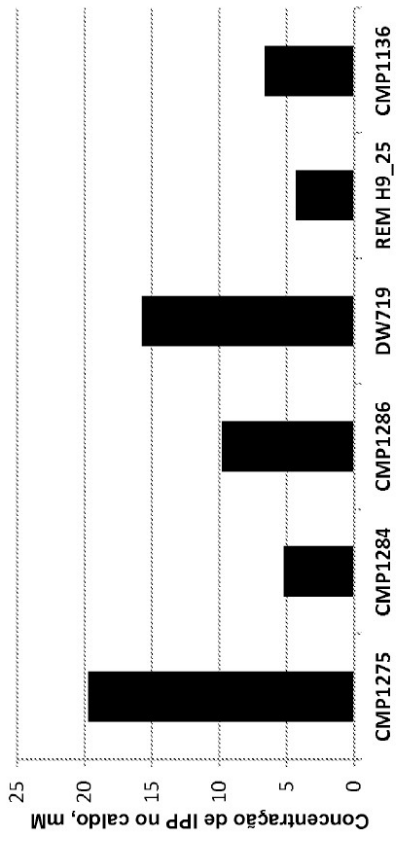

Níveis de IPP em 44 h
Concentração de IPP no caldo, mM
0
5
10
15
20
25
CMP1275
CMP1284
CMP1286
DW719
REM H9_25
CMP1136

Figura 36

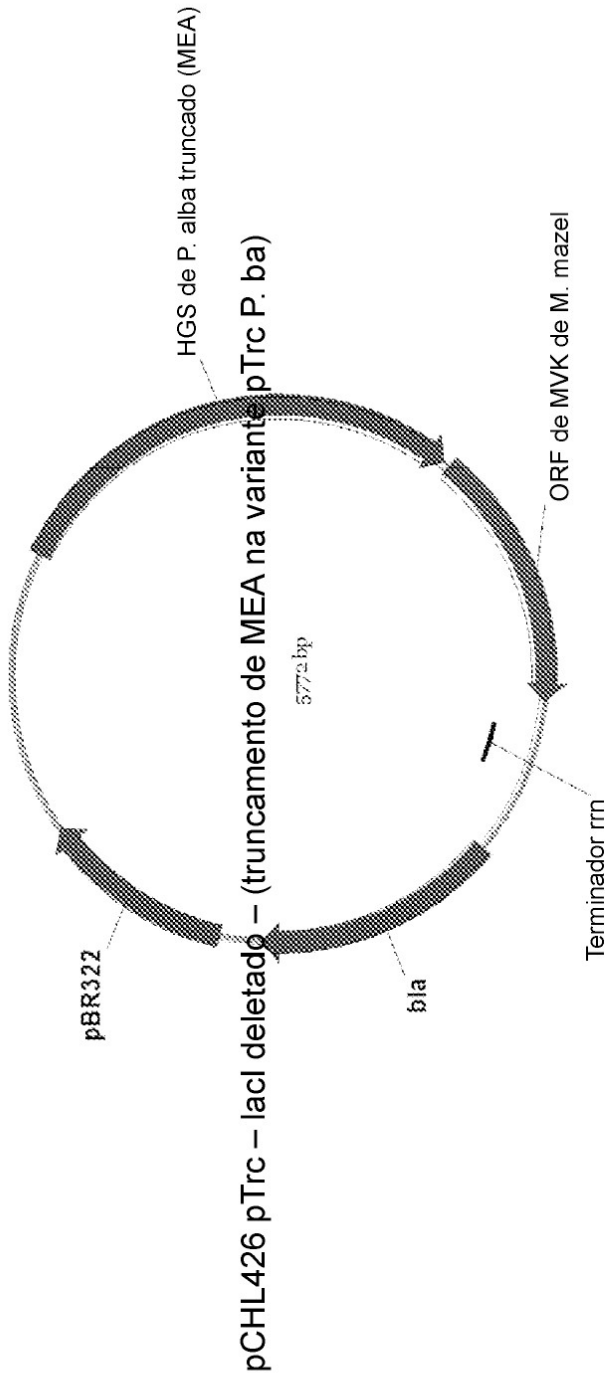

pCHL426 pTrc – lacI deletado – (truncamento de MEA na variante pTrc P. ba)
5772 bp
HGS de P. alba truncado (MEA)
ORF de MVK de M. mazei
Terminador rrn
bla
pBR322

Figura 37

gtttgacagcttatcatcgactgcacggtgcaccaatgcttctggcgtcaggcagccatcggaagctgtggtatggctgtgcaggtcgtaaatcactgcataattcgtgtcgctcaaggcgcactcccgttctggataatgtttttgcgccgacatcata
acggttctggcaaatattctgaaatgagctgttgacaattaatcatccggctcgtataatgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagcgccgctgagaaaaagcgaagcggcactgctctttaacaatttatcagacaatctgtg
tgggcactcgaccggaattatcgattaactttattattaaaaattaaagaggtatatattaatgtatcgattaaataaggaggaataaaccatggaaacgcgtcgttctgcgaactacgaacctaacagctgggactatgattacctgctgtcctccgacac
ggacgagtccatcgaagtatacaaagacaaagcgaaaaagctggaagccgaagttcgtcgcgagattaataacgaaaaagcagaatttctgaccctgctggaactgattgacaacgtccagcgcctgggcctgggttaccgtttcgagtctgatat
ccgtggtgcgctggatcgcttcgtttcctccggcggcttcgatgcggtaaccaagacttccctgcacggtacggcactgtctttccgtctgctgcgtcaacacggttttgaggtttctcaggaagcgttcagcggcttcaaagaccaaaacggcaactt
cctggagaacctgaaggaagatatcaaagctatcctgagcctgtacgaggccagcttcctggctctggaaggcgaaaacatcctggacgaggcgaaggttttcgcaatctctcatctgaaagaactgtctgaagaaaagatcggtaaagagctgg
cagaacaggtgaaccatgcactggaactgccactgcatcgccgtactcagcgtctggaagcagtatggtctatcgaggcctaccgtaaaaaggaggacgcgaatcaggttctgctggagctggcaatttctggattacaacatgatccagtctgtata
ccagcgtgatctgcgtgaaacgtcccgttggtggcgtcgtgtgggtctggcgaccaaactgcacttttgctcgtgaccgcctgattgagagcttctactgggccgtgggtgtagcattcgaaccgcaatactccgactgccgtaactccgtcgcaaaa
atgttttgtttcgtaaccattatcgacgatatctacgatgtatacggcaccctggacgaactggagctgtttactgatgcagttgagcgttgggacgtaaacgccatcaacgacctgccggattacatgaaactgtgctttctggctctgtataacactatta
acgaaatcgcctacgacaacctgaaagataaaggtgagaacatcctgccgtatctgaccaaagcctgggctgacctgtgcaacgctttcctgcaagaagccaagtggctgtacaacaaatctactccgacctttgacgactacttcggcaacgcat
ggaaatcctcttctggcccgctgcaactggtgttcgcttacttcgctgtcgtgcagaacattaaaaaggaagagatcgaaaacctgcaaaaatacccatgacaccatctctcgtcctttcccatatcttccgtctgtgcaatgacctggctagcgcgtctgc
ggaaattgcgcgtggtgaaaccgcaaatagcgtttcttgttacatgcgcactaaaggtatctccgaagaactggctaccgaaagcgtgatgaatctgatcgatgaatattggaaaaagatgaacaaggaaaaactgggtggtagcctgttcgcgaaa
ccgttcgtggaaaccgcgatcaacctggcacgtcaatctcactgcacttatcataacggcgacgcgcatacctctccggatgagctgacccgcaaacgcgttctgtctgtaatcactgaaccgattctgccgtttgaacgctaactgcataaaggagg
taaaaaaacatggtatcctgttctgcgccgggtaagatttaccttgttcggtgaacacgccgtagtttatggcgaaactgcaattgcgtgtgcggtggaactgcgtacccgtgttcgcgcggaactcaatgactctatcactattcagagccagatcggc
cgcaccggtctggatttcgaaaagcaccctatgtgtctgcggtaattgagaaaatgcgcaaatctattcctattaacggtgttttcttgaccgtcgattccgacatcccggtgggctccggtctgggtagcagcgcagccgttactatcgcgtctattggt
gcgctgaacgagctgttcggctttggcctcagcctgcaagaaatcgctaaactgggccacgaaatcgaaattaaagtacagggtgccgcgtccccaaccgatacgtatgtttctaccttcggcggcgtggttaccatcccggaacgtcgcaaactg
aaaactccggactgcggcattgtgattggcgataccggcgttttctcctccaccaaagagttagtagctaacgtacgtcagctgcgcgaaagctacccggatttgatcgaaccgctgatgaccctcttattggcaaaatctctcgtatcggcgaacaactg
gttctgtctggcgactacgcatccatcggccgcctgatgaacgtcaaccagggtctcctggacgccctgggcgttaacatcttagaactgagccagctgatctattccgctcgtgcggcaggtgcgtttggcgctaaaatcacgggcgctggcggc
ggtggctgtatggttgcgctgaccgctccggaaaaatgcaaccaagtggcagaagcggtagcaggcgctggcggtaaagtgactatcactaaaccgaccgagcaaggtctgaaagtagattaaagtctagttaaagtttaaacggtctccagcttg
gctgttttggcggatgagagaagattttcagcctgatacagattaaatcagaacgcagaagcggtctgataaaacagaatttgcctggcggcagtagcgcggtggtcccacctgaccccatgccgaactcagaagtgaaacgccgtagcgccgat
ggtagtgtggggtctccccatgcgagagtagggaactgccaggcatcaaataaaacgaaaggctcagtcgaaagactgggccttcgttttatctgttgtttgtcggtgaacgctctcctgagtaggacaaatccgccgggagcggatttgaacgttg
cgaagcaacggcccggagggtggcgggcaggacgcccgccataaactgccaggcatcaaattaagcagaaggccatcctgacggatggcctttttgcgtttctacaaactctttttgtttatttttctaaatacattcaaatatgtatccgctcatgaga
caataaccctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagagtatgagtattcaacatttccgtgtcgcccttattcccttttttgcggcattttgccttcctgtttttgctcacccagaaacgctggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgca
cgagtgggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagttttcgccccgaagaacgttttccaatgatgagcacttttaaagttctgctatgtggcgcggtattatcccgtgttgacgccgggcaagagcaactcggtcgccgcata
cactattctcagaatgacttggttgagtactcaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgctgccataaccatgagtgataacactgcggccaacttacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagc
taaccgcttttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccatacccaaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaaactattaactggcgaactacttac
tctagcttcccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaagttgcaggaccacttctgcgctcggcccttccggctggctggtttattgctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcactgggggccagatg
gtaagccctcccgtatcgtagttatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgctgagataggtgcctcactgattaagcattggtaactgtcagaccaagtttactcatatatactttagattgatttaaaacttcatt
tttaatttaaaaggatctaggtgaagatccttttgataatctcatgaccaaaatcccttaacgtgagttttcgttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatcctttttttctgcgcgtaatctgctgcttgcaaacaaaaa
aaccaccgctaccagcggtggtttgtttgccggatcaagagctaccaactctttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaaatactgtccttctagtgtagccgtagttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacat
acctcgctctgctaatcctgttaccagtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttggactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggtcgggctgaacgggggttcgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacc
tacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcgccacgcttcccgaagggagaaaggcggacaggtatccggtaagcggcagggtcggaacaggagagcgcacgagggagcttccagggggaaacgcctggtatctttata
gtcctgtcgggtttcgccacctctgacttgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcaggggggcggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggcctttttacggttcctggccttttgctggccttttgctcacatgttctttcctgcgttatcccctgattct
gtggataaccgtattaccgcctttgagtgagctgataccgctcgccgcagccgaacgaccgagcgcagcgagtcagtgagcgaggaagcggaagagcgcctgatgcggtattttctccttacgcatctgtgcggtatttcacaccgcatatggtgc
actctcagtacaatctgctctgatgccgcatagttaagccagtatacactccgctatcgctacgtgactgggtcatggctgcgccccgacacccgccaacacccgctgacgcgccctgacgggcttgtctgctcccggcatccgcttacagacaag
ctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcagaggttttcaccgtcatcaccgaaacgcgcgaggcagcagatcaattcgcgcgcgaaggcgaagcggcatgcatttacgttgacaccatcgaatggtgcaaaacctttcgcggtatggcatgata
gcgcccggaagagagtcaattcagggtgtgagcgcaacgcaattaatgtgagttagcgcgaattgatctg

Figura 38

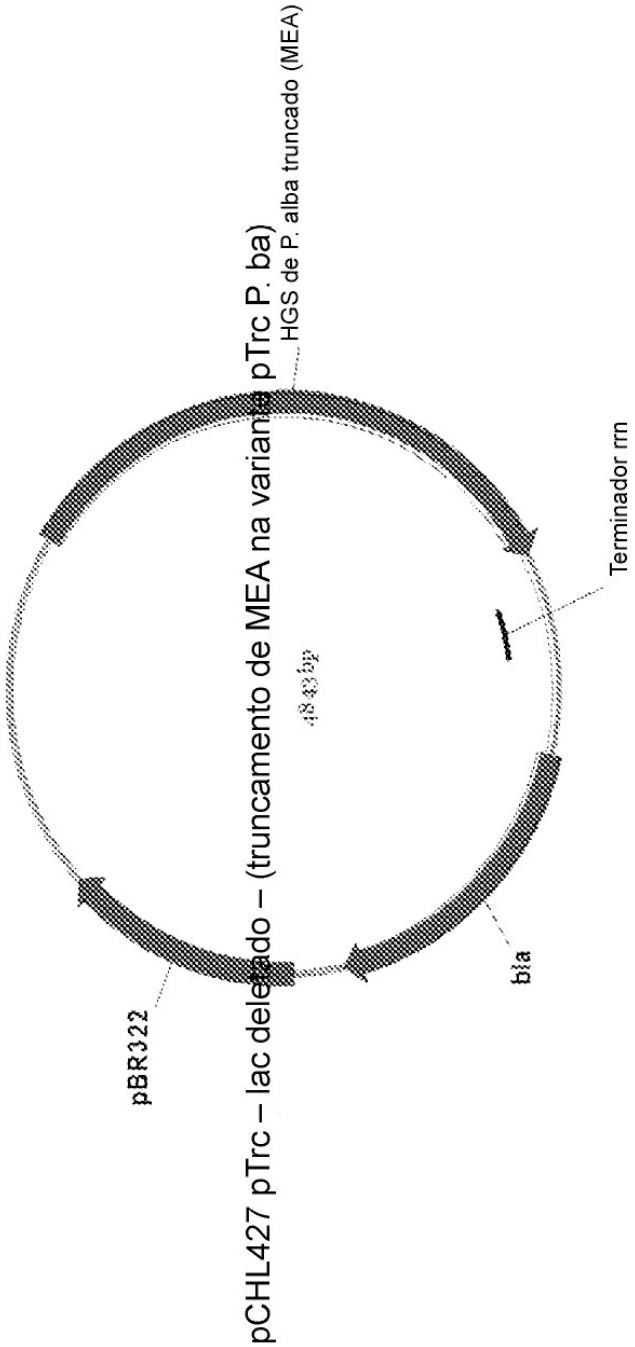

pCHL427 pTrc – lac deletado – (truncamento de MEA na variante pTrc P. ba)
HGS de P. alba truncado (MEA)
Terminador rrn
bla
pBR322

Figura 39

Figura 40

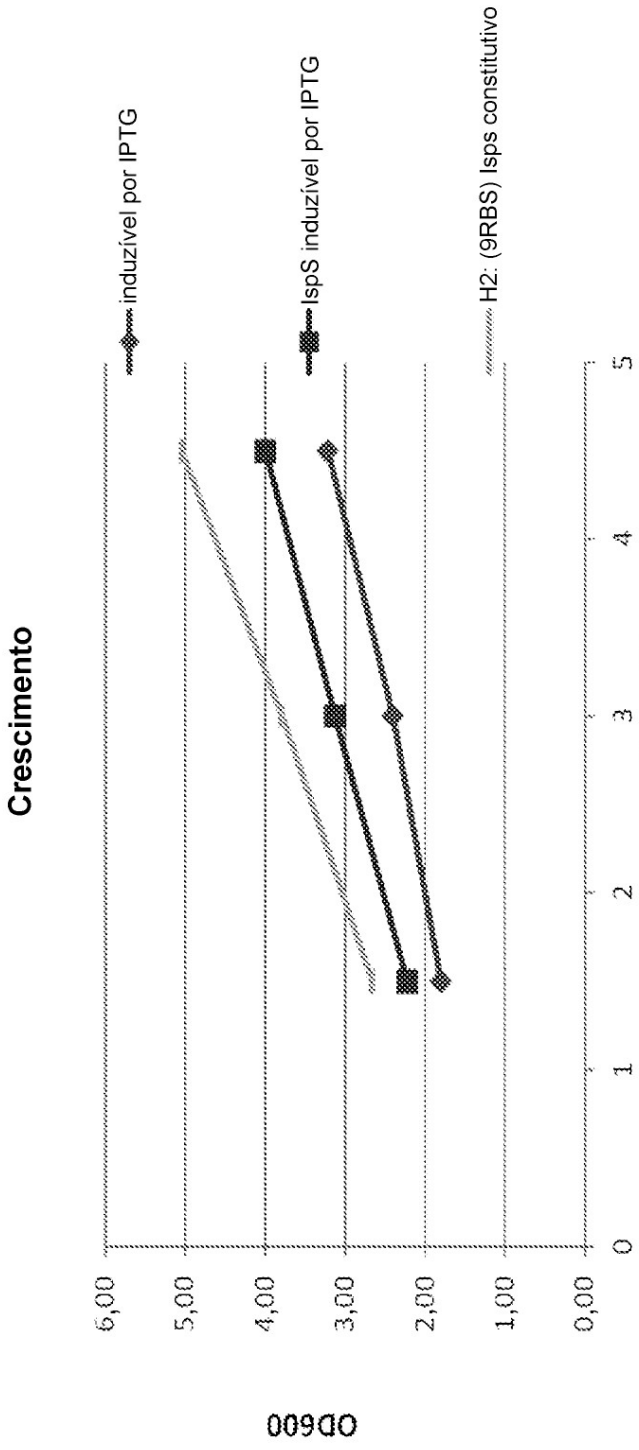

Crescimento
induzível por IPTG
IspS induzível por IPTG
H2: (9RBS) Isps constitutivo
OD600
6,00
5,00
4,00
3,00
2,00
1,00
0,00
0
1
2
3
4
5
Tempo (h)

Figura 41

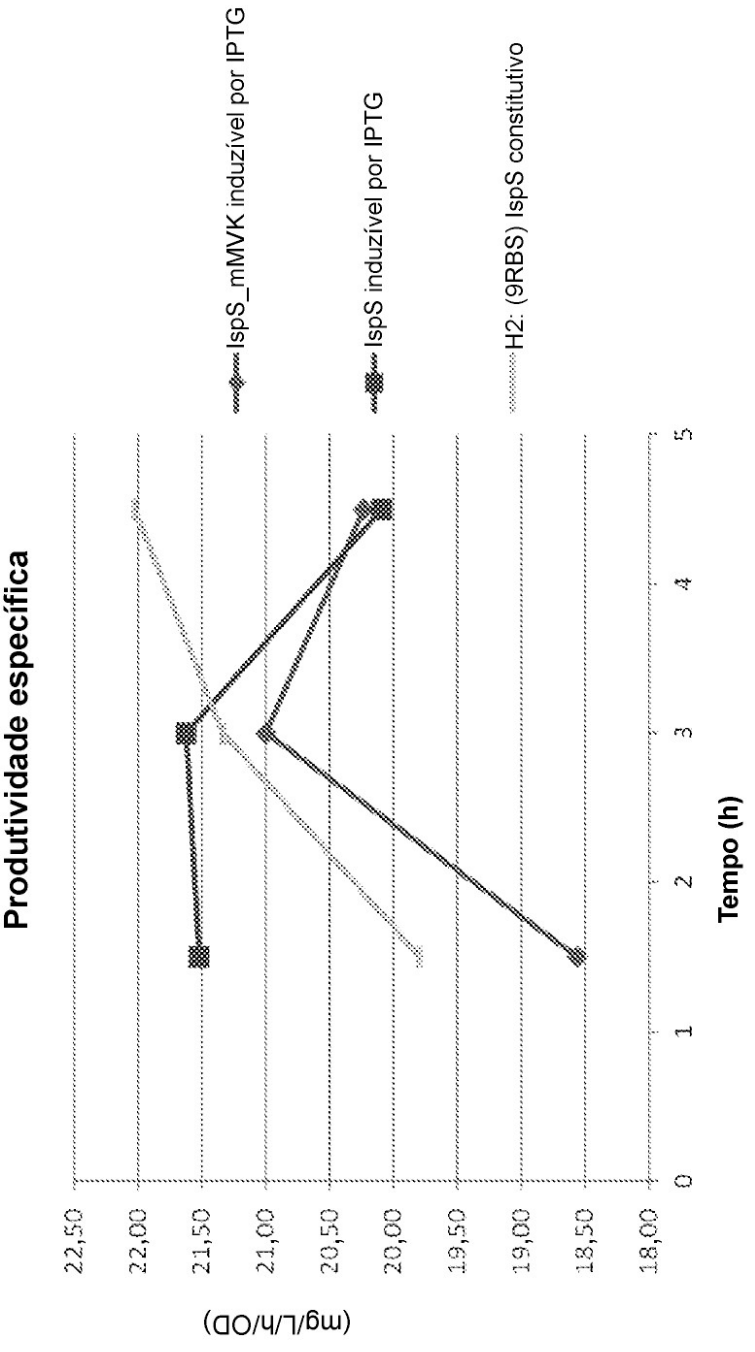

Produtividade específica
(mg/L/h/OD)
22,50
22,00
21,50
21,00
20,50
20,00
19,50
19,00
18,50
18,00
0
1
2
3
4
5
Tempo (h)
IspS_mMVK induzível por IPTG
IspS induzível por IPTG
H2: (9RBS) IspS constitutivo

Figura 42

RESUMO

Patente de Invenção **"PRODUÇÃO ACENTUADA DE ISOPRENO COM O USO DE CÉLULAS HOSPEDEIRAS TENDO ATIVIDADE DE ISPA DIMINUÍDA"**

A presente invenção refere-se a micro-organismos recombinantes capazes de produzir isopreno e à produção de isopreno com o uso de tais micro-organismos recombinantes, com boa eficiência. Nesta invenção, a atividade funcional do gene *ispA* é alterada para reduzir a produção de moléculas de isoprenoide em células recombinantes manipuladas para produzir isopreno ou em células de outro modo suscetíveis ao acúmulo de isoprenoide durante a fermentação. Esta atividade funcional diminuída do gene *ispA* permite síntese acentuada de isopreno em um micro-organismo hospedeiro.

POWER OF ATTORNEY / PROCURAÇÃO

The undersigned / O(s) abaixo assinado(s)

Name/Nome: The Goodyear Tire & Rubber Company (Sociedade norte-americana)

Address/Endereço: 200 Innovation Way, Akron OH 44316 – US (Estados Unidos da América)

hereby grant(s) powers to DANNEMANN, SIEMSEN, BIGLER & IPANEMA MOREIRA, PROPRIEDADE INDUSTRIAL LTDA., CNPJ 33.163.049/0001-14, with offices at Rua Marquês de Olinda, nº 70, in the city of Rio de Janeiro, State of Rio de Janeiro and at Avenida Indianópolis, nº 739, in the city of São Paulo, State of São Paulo, Brazil, to represent the grantor(s) before the competent federal, state and municipal governmental agencies and authorities in Brazil, Banks, Central Bank of Brazil for the purposes of obtaining and maintaining intellectual property rights, such as patents of invention and utility models, certificates of addition to patents of invention, registration of trade, service, collective and certification marks as well as registration of geographical indications, and of industrial designs and software. To that end, the grantee is empowered to apply for renewal of protection, make declarations, file oppositions, contestations, replies or appeals; request voluntary reversal of decisions, respond to oppositions and appeals, have access to the official records; comply with official requirements; present written or oral defences; desist, answer, settle, and/or effect payments and receive returns, and emit the respective receipts, of official fees of any nature, including governmental taxes; receive, submit and withdraw documents; apply for and reply to applications for forfeiture; initiate or submit replies to administrative nullity proceedings; apply for or contest applications for compulsory licenses; comply with any formal requirements; apply for the recordal of transfer of title and ownership, and/or change of name and address; apply for the recordal of patent, design and trade mark license agreements as well as of any agreements related to intellectual property rights and transfer of know-how, including franchise agreements; serve extrajudicial cease and desist and warning letters; represent the grantor(s) before the courts, receive summonses on behalf of the grantor(s) exclusively in cases specifically relating to industrial property matters and finally, to take any steps necessary in order to defend the interests of the grantor(s). The grantee is further entitled to substitute the powers hereby granted, in whole or in part. Any acts previously practised by the grantee on behalf of the grantor(s) are hereby expressly ratified. ***This power of attorney is limited to the filing and prosecution of the BR patent application equivalent to PCT/US2012/071518 filed on 21.12.2012 and the related BR patent when granted.***

pela presente concede(m) poderes a DANNEMANN, SIEMSEN, BIGLER & IPANEMA MOREIRA, PROPRIEDADE INDUSTRIAL LTDA., CNPJ 33.163.049/0001-14, com escritórios na Rua Marquês de Olinda, 70, na cidade do Rio de Janeiro, RJ, e na Avenida Indianópolis, 739, na cidade de São Paulo, SP, República Federativa do Brasil, para representar a(s) outorgante(s) perante as autoridades e órgãos governamentais federais, estaduais e municipais do Brasil, bancos e instituições financeiras, Banco Central do Brasil, com vistas a obter e manter a proteção de direitos de propriedade intelectual, tais como patentes de invenção e de modelo de utilidade, certificado de adição de invenção, registro de marca de produto e de serviço, de marca coletiva, de marca de certificação e das indicações geográficas, registro de desenho industrial, registro de "software", podendo, para tanto, requerer prorrogação dos prazos de proteção, fazer declarações, opor, protestar, impugnar, recorrer, pedir reconsideração, manifestar-se sobre oposições e recursos, obter vista de processos, cumprir exigências, apresentar defesas escritas ou orais, desistir, replicar, transigir, efetuar pagamentos e receber restituições, dando as respectivas quitações, de taxas, retribuições e impostos, receber, juntar e retirar documentos, requerer caducidade e contestar pedido de caducidade, requerer e contestar nulidade administrativa e licença compulsória, preencher qualquer tipo de formalidade, requerer anotação e averbação de cessão, alterações de nome e de sede, de contratos de licença de exploração de patente, de licença de uso de marca, de licença de uso de desenho industrial, bem como de qualquer outro contrato que envolva propriedade intelectual e transferência de tecnologia, inclusive contratos de franquia, promover notificações, interpelações e protestos extrajudiciais e mais quaisquer outros atos em defesa dos interesses da(s) outorgante(s), representar a(s) outorgante(s) em juízo, receber citações unicamente em litígios relativos especificamente à propriedade industrial e, ainda, substabelecer, no todo ou em parte, os presentes poderes, ficando expressamente ratificados todos os atos anteriormente praticados pela outorgada em nome da(s) outorgante(s). ***Essa procuração é limitada ao depósito e processamento do pedido de patente Brasileiro equivalente ao PCT/US2012/071518 depositado em 21.12.2012 e a respectiva patente brasileira quando concedida.***

Place & date / Local e data : Akron, Ohio July 25, 2014 (25 de julho de 2014)

Signed by / Assinada por : Bruce J. Hendricks

duly authorised by the grantor(s) / devidamente autorizado(s) pela(s) outorgante(s)

Position / Cargo : Associate General Counsel (Consultor geral associado)

Nationality(ies) / Nacionalidade(s) : United States of America (norte-americana)

Address(es) / Domicílio(s) : 200 Innovation Way, Akron, Ohio 44316

Signature(s) / Assinatura(s) : 7/25/2014

(25/07/2014)

13º Ofício de Notas
Luiz Fernando Carvalho de Faria - Tabeliao - Notarisisa
Av. Rio Branco 135 - Grupo 312 - RJ - Tel. 2224-8423
Certifico que a presente é cópia fiel do original que foi exibido.