



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

(11) BR 122019026142-3 B1



(22) Data do Depósito: 02/04/2013

(45) Data de Concessão: 14/12/2021

(54) Título: CÉLULA HOSPEDEIRA RECOMBINANTE

(51) Int.Cl.: C12N 9/04; C12N 9/02; C12N 9/10; C12N 9/12; C12N 9/88; (...).

(30) Prioridade Unionista: 02/04/2012 US 61/619,324.

(73) Titular(es): GENOMATICA, INC..

(72) Inventor(es): DEREK L. GREENFIELD; ANDREAS W. SCHIRMER; ELIZABETH J. CLARKE; ELI S. GROBAN; BERNARDO M. DA COSTA; ZHIHAO HU.

(86) Pedido PCT: PCT US2013035037 de 02/04/2013

(87) Publicação PCT: WO 2013/152051 de 10/10/2013

(85) Data do Início da Fase Nacional: 10/12/2019

(62) Pedido Original do Dividido: BR112014024675-0 - 02/04/2013

(57) Resumo: A revelação refere-se a células hospedeiras recombinantes que incluem modificações de cepa eficazes para aprimorar a titulação, o rendimento e/ou a produtividade de derivados de ácido graxo. A revelação se refere adicionalmente a culturas celulares que incluem as células hospedeiras recombinantes para a produção fermentativa de derivados de ácido graxo e composições dos mesmos.

CÉLULA HOSPEDEIRA RECOMBINANTE

(Dividido do BR 1120140246750, depositado em 02/04/2013)

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

[001] Este pedido reivindica o benefício do Pedido Provisório no U.S. 61/619.324, depositado em 2 de abril de 2012, o qual está incorporado em sua totalidade a título de referência.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

[002] O pedido presente contém a Listagem de Sequências que foi enviada em formato ASCII através de EFS-Web e está incorporada ao presente documento em sua totalidade a título de referência. A dita cópia ASCII, criada em 2 de abril de 2013, é nomeada como LS00042PCT_SL.txt e tem 143.098 bites de tamanho.

CAMPO

[003] O pedido refere-se a células hospedeiras recombinantes incluindo modificações de cepa eficazes na melhora de titulação, rendimento e/ou produtividade de derivados de ácido graxo. A revelação se refere adicionalmente a culturas celulares incluindo as células hospedeiras recombinantes para a produção fermentativa de derivados de ácido graxo e composições dos mesmos.

ANTECEDENTES

[004] Derivados de ácido graxo incluindo aldeídos graxos, álcoois graxos, hidrocarbonetos (alcanos e olefinas), ésteres graxos (por exemplo, ceras, ésteres de ácido graxo ou ésteres graxos) e cetonas constituem categorias importantes de substâncias químicas industriais e combustíveis. Essas moléculas e seus derivados têm numerosas aplicações incluindo, mas sem limitação ao uso

como tensoativos, lubrificantes, plastificantes, solventes, emulsificadores, emolientes, espessantes, aromatizantes, fragrâncias e combustíveis. O petróleo bruto é atualmente uma fonte principal de materiais brutos para produzir substâncias petroquímicas e combustíveis. As duas classes principais de materiais brutos derivados do petróleo são olefinas de cadeia curta (por exemplo, etileno e propileno) e aromáticas (por exemplo, isômeros de benzeno e xileno). Esses materiais brutos são derivados de hidrocarbonetos de cadeias mais longas no petróleo bruto craqueando-o mediante um custo considerável com o uso de vários métodos, tais como craqueamento catalítico, craqueamento a vapor ou reformação catalítica. Esses materiais brutos podem ser usados para produzir substâncias petroquímicas tais como monômeros, solventes, detergentes e adesivos que, de outra forma, não podem ser diretamente refinados a partir do petróleo bruto. As substâncias petroquímicas, por sua vez, podem ser usadas para produzir substâncias químicas especiais, tais como plásticos, resinas, fibras, elastômeros, substâncias farmacêuticas, lubrificantes, géis e similares. As substâncias químicas especiais particulares que podem ser produzidas a partir de materiais brutos petroquímicos incluem, mas não se limitam a ácidos graxos, hidrocarbonetos, aldeídos graxos, álcoois graxos, ésteres e cetonas.

[005] Hidrocarbonetos, por exemplo, têm vários usos comerciais. Sendo assim, alcanos e alcenos de cadeia mais curta são usados em combustíveis de transporte. Os alcenos de cadeia mais longa são usados em plásticos, lubrificantes, e lubrificantes sintéticos. Adicionalmente,

os alcenos são usados como uma matéria-prima para produzir álcoois, ésteres, plastificantes, tensoativos, aminas terciárias, agentes de recuperação aprimorada de óleo, ácidos graxos, tióis, anidridos alcenilsuccínicos, epóxidos, alcanos clorados, alcenos clorados, ceras, aditivos de combustível e redutores de fluxo de arraste. De maneira similar, os ésteres possuem muitos usos comerciais. Por exemplo, o biodiesel, um combustível alternativo, é feito de ésteres (por exemplo, éster metílico de ácido graxo, ésteres etílicos de ácido graxo, etc.). Alguns ésteres de baixo peso molecular são voláteis e têm um cheiro agradável, o que os torna úteis como fragrâncias ou agentes aromatizantes. Adicionalmente, os ésteres são usados como solventes para lacas, tintas e vernizes. Ademais, algumas substâncias de ocorrência natural, tais como ceras, gorduras e óleos também são feitos de ésteres. Os ésteres são usados adicionalmente como agentes amaciantes em resinas e plásticos, plastificantes, retardantes de chamas e aditivos em gasolina e óleo. Adicionalmente, os ésteres podem ser usados na fabricação de polímeros, filmes, produtos têxteis, corantes e substâncias farmacêuticas.

[006] Os aldeídos são usados para produzir uma grande variedade de substâncias químicas especiais. Por exemplo, os aldeídos são usados para produzir polímeros, resinas (por exemplo, Bakelite), corantes, aromatizantes, plastificantes, perfumes, substâncias farmacêuticas e outras substâncias químicas, algumas das quais podem ser usadas como solventes, conservantes ou desinfetantes. Adicionalmente, certos compostos naturais e sintéticos,

tais como vitaminas e compostos usados como hormônios, são aldeídos. Ademais, muitos açúcares contêm grupos aldeído. Os aldeídos graxos podem ser convertidos em álcoois graxos através de redução química ou enzimática. De maneira similar, os álcoois graxos possuem muitos usos comerciais também. Os álcoois graxos de cadeia mais curta são usados nas indústrias cosmética e alimentícia como emulsificadores, emolientes e espessantes. Devido à sua natureza anfifílica, os álcoois graxos se comportam como tensoativos não iônicos, que são úteis em produtos de cuidados pessoais e domésticos, tais como, por exemplo, detergentes. Adicionalmente, os álcoois graxos são usados em ceras, gomas, resinas, pomadas e loções farmacêuticas, aditivos de óleo lubrificante, agentes têxteis antiestática e de acabamento, plastificantes, cosméticos, solventes industriais e solventes para gorduras. Os álcoois graxos tais como os álcoois alifáticos incluem uma cadeia de 8 a 22 átomos de carbono. Os álcoois graxos normalmente têm um número par de átomos de carbono e um único grupo álcool (-OH) anexados ao carbono de terminação. Alguns são insaturados e alguns são ramificados. Os mesmos são amplamente usados em química industrial. A maioria dos álcoois graxos na natureza é encontrada como ceras que são ésteres com ácidos graxos e álcoois graxos. Os mesmos são produzidos por bactérias, plantas e animais. Presentemente, os álcoois graxos são produzidos através da hidrogenação catalítica de ácidos graxos produzidos a partir de fontes naturais, tais como óleo de coco, azeite de dendê, óleo de semente de palma, sebo e banha de porco, ou por hidratação química de alfa-olefinas produzidas a partir de matérias-

primas petroquímicas. Os álcoois graxos derivados a partir de fontes naturais têm comprimentos variados de cadeia. O comprimento da cadeia de álcoois graxos é importante e específico para aplicações particulares. A desidratação de álcoois graxos em alfa-olefinas pode também ser conseguida por catálise química.

[007] Devido aos desafios inerentes apresentados pela exploração, extração, transporte e refino de petróleo para uso em produtos químicos e combustíveis, há uma necessidade na técnica de uma fonte alternativa que pode ser produzida econômica e eficientemente para o uso na produção química e de combustíveis. Além disso, a queima de combustíveis baseados em petróleo se tornou uma ameaça séria ao meio ambiente, especialmente em luz do crescimento permanente da população que habita o planeta. Assim, há uma necessidade para um substituinte do petróleo que não cause o tipo de dano ambiental criado pela exploração, extração, transporte e refino do petróleo.

[008] Uma opção para produzir petróleo renovável é alterar por engenharia as células hospedeiras para produzir produtos renováveis de petróleo. Combustíveis biologicamente derivados e substâncias químicas oferecem vantagens em comparação com combustíveis baseados em petróleo. Substâncias químicas biologicamente derivadas, tais como hidrocarbonetos (por exemplo, alcanos, alcenos, ou alcinos), álcoois graxos, ésteres, ácidos graxos, aldeídos graxos, e cetonas são diretamente convertidos a partir de biomassa no produto químico desejado. Entretanto, a fim de usar os derivados de ácido graxo biologicamente derivados de açúcares fermentáveis ou de biomassa para que

sejam comercialmente viáveis como uma fonte para a produção de substâncias químicas e combustíveis renováveis, o processo precisa ser aperfeiçoado para conversão e recuperação eficientes do produto. O desenvolvimento de combustíveis e substâncias químicas biologicamente derivados tem sido um foco de pesquisa e desenvolvimento em anos recentes. Ainda assim, permanece uma necessidade considerável de melhoras nos processos e produtos relevantes a fim de que combustíveis e substâncias químicas biologicamente derivados se tornem uma opção comercialmente viável. As áreas que precisam de melhorias incluem a eficiência energética do processo de produção e o rendimento do produto final. A presente revelação aborda essa necessidade.

SUMÁRIO

[009] Um aspecto da revelação fornece uma célula hospedeira recombinante que tem uma sequência de polinucleotídeos geneticamente modificada, sendo que a sequência de polinucleotídeos codifica para um ou mais polipeptídeos que têm uma atividade enzimática específica. A sequência de polinucleotídeos é exógena ou endógena à célula hospedeira. Sendo assim, a revelação fornece uma célula hospedeira recombinante que tem uma sequência de polinucleotídeos geneticamente modificada que codifica um ou mais polipeptídeos, sendo que os polipeptídeos têm uma atividade selecionada a partir do grupo que inclui, mas sem limitação a uma atividade de 3-hidroxidecanoil-[acp] desidratase (E.C. 4.2.1.60); atividade de β -cetoacil-ACP sintase I (E.C. 2.3.1.41); atividade de β -cetoacil-ACP sintase II (E.C. 2.3.1.179); atividade de [acp] S-

maloniltransferase {malonil-CoA-ACP transacilase} (E.C. 2.3.1.39); atividade de 3-oxoacil- $\{\beta$ -cetoacil}-ACP redutase (E.C. 1.1.1.100); atividade de β -cetoacil-ACP sintase III (E.C.2.3.1.180); atividade de enoil-ACP redutase (NADH) (E.C. 1.3.1.9); atividade de enoil-ACP redutase (NADPH) (E.C. 1.3.1.10); atividade de 3-hidróxi-acil-[acp] desidratase (E.C. 4.2.1.59); e atividade de *trans*-2, *cis*-3-decenoil-ACP isomerase (E.C. 5.3.3.14), sendo que a célula hospedeira recombinante produz uma composição de derivado de ácido graxo a uma titulação, rendimento ou produtividade maior do que uma célula hospedeira do tipo selvagem correspondente quando cultivada em um meio contendo uma fonte de carbono sob condições eficazes para expressar o polinucleotídeo. Em um aspecto relacionado, a célula hospedeira recombinante produz a composição de derivado de ácido graxo em uma titulação, rendimento e/ou produtividade maior quando o polipeptídeo for expresso em combinação com pelo menos um outro polipeptídeo da atividade enzimática. Em outro aspecto, a célula hospedeira recombinante produz a composição de derivado de ácido graxo a uma titulação, rendimento ou produtividade maior quando o polipeptídeo for expresso em combinação com pelo menos cinco outros polipeptídeos da atividade enzimática. Em ainda outro aspecto, a célula hospedeira recombinante produz a composição de derivado de ácido graxo a uma titulação, rendimento ou produtividade maior quando expressa em combinação com pelo menos dois ou três ou quatro ou cinco ou seis ou mais polipeptídeos da atividade enzimática. Em outro aspecto relacionado, a célula hospedeira recombinante inclui uma ou mais sequências de polinucleotídeos

geneticamente modificadas que codificam adicionalmente para um polipeptídeo que é uma proteína carreadora de acila (ACP). A ACP pode ser expressa em combinação com um ou mais dos polipeptídeos que codificam para qualquer uma das atividades enzimáticas, sendo que a ACP aumenta adicionalmente a titulação, rendimento e/ou produtividade da célula hospedeira recombinante quando cultivada sob condições apropriadas. Em ainda outro aspecto relacionado, uma sequência de polinucleotídeos geneticamente modificada codifica adicionalmente um polipeptídeo que tem uma atividade de accABCD (E.C. 6.4.1.2). A accABCD pode ser expressa em combinação com um ou mais dos polipeptídeos que codificam para qualquer uma das atividades enzimáticas, sendo que a accABCD aumenta adicionalmente a titulação, rendimento e/ou produtividade da célula hospedeira recombinante quando cultivada sob condições apropriadas.

[0010] Outro aspecto da revelação fornece uma célula hospedeira recombinante que tem uma sequência de polinucleotídeos geneticamente modificada que codifica um ou mais polipeptídeos, sendo que os polipeptídeos têm uma atividade enzimática que inclui, mas sem limitação a atividade de *trans*-2, *cis*-3-decenoil-ACP isomerase (fabA ou fabM); β -cetoacil-ACP sintase I (fabB); malonil-CoA-ACP transacilase (fabD); β -cetoacil-ACP sintase I (fabF ou fabB); β -cetoacil-ACP redutase (fabG); β -cetoacil-ACP sintase III (fabH); enoil-ACP redutase (fabI ou fabL ou fabV ou fabK); e 3-hidrox-acil-[acp] desidratase (fabA ou fabZ); *trans*-2-enoil-ACP redutase II (fabK). Em um aspecto relacionado, o polipeptídeo é selecionado dentre fabA, fabB, fabD, fabF, fabG, fabH, fabI, fabL, fabV, fabZ, fabM,

e fabK e ou combinações dos mesmos. Em ainda outro aspecto relacionado, o polipeptídeo é selecionado dentre FabA de *Salmonella typhimurium* (NP_460041); FabB de *Escherichia coli* (NP_416826); FabD de *Salmonella typhimurium* (NP_460164); FabG de *Salmonella typhimurium* (NP_460165); FabH de *Salmonella typhimurium* (NP_460163); FabZ de *Salmonella typhimurium* (NP_459232); FabM de *Streptococcus mutans* (AAN59379); FabK de *Streptococcus pneumoniae* (AAF98273); FabV de *Vibrio cholera* (YP_001217283); FabF de *Clostridium acetobutylicum* (NP_350156); FabI de *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 (NP_389054); FabL de *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 (NP_388745); FabI a *Acinetobacter* sp. ADP1 (YP_047630); FabI de *Marinobacter aquaeoli* VT8 (YP_958813); FabI de *Rhodococcus opacus* B4 (YP_002784194); FabH de *Acinetobacter* sp. ADP1 (YP_046731); FabH de *Marinobacter aquaeoli* VT8 (YP_958649); e FabH de *Rhodococcus opacus* B4 (YP_00278448) ou combinações dos mesmos.

[0011] A revelação contempla adicionalmente uma célula hospedeira recombinante que tem uma sequência de polinucleotídeos geneticamente modificada que codifica um polipeptídeo de ACP, sendo que a célula hospedeira recombinante produz uma composição de derivado de ácido graxo a uma titulação, rendimento ou produtividade maior do que uma célula hospedeira do tipo selvagem correspondente quando cultivada em um meio contendo uma fonte de carbono sob condições eficazes para expressar o polipeptídeo de ACP. Em um aspecto relacionado, a sequência de polinucleotídeos geneticamente modificada codifica adicionalmente um polipeptídeo que tem uma atividade de

fosfopanteteinil transferase (E.C. 2.7.8.7). No presente documento, a sequência de polinucleotídeos geneticamente modificada inclui um gene *sfp* que codifica uma fosfopanteteinil transferase (E.C. 2.7.8.7). Em um aspecto relacionado, uma sequência de polinucleotídeos geneticamente modificada codifica adicionalmente um polipeptídeo que tem uma atividade de accABCD (E.C. 6.4.1.2). A ACP pode ser expressa em combinação com accABCD e/ou com uma fosfopanteteinil transferase, sendo que a combinação de quaisquer dentre os polipeptídeos expressos leva a aumentos adicionais na titulação, rendimento e/ou produtividade da célula hospedeira recombinante quando cultivados sob condições apropriadas. Em outro aspecto relacionado, a ACP é derivada do mesmo organismo que uma enzima de trajetória terminal expressa na célula hospedeira recombinante, sendo que a enzima de terminação cliva qualquer espécie de acil-ACP que seja parte da trajetória biossintética do ácido graxo. A ACP é exógena ou endógena à célula hospedeira.

[0012] A revelação engloba adicionalmente uma célula hospedeira recombinante que inclui uma sequência de polinucleotídeos geneticamente modificada incluindo um transpóson, sendo que a inserção do transpóson em um gene *yijP* afeta um segundo gene que flanqueia o gene *yij*, sendo que o segundo gene codifica para um polinucleotídeo que é regulado ascendente ou descendentemente e em que o polinucleotídeo regulado ascendente ou descendentemente codifica para um polipeptídeo que afeta a produção de uma composição de derivado de ácido graxo quando a célula hospedeira é cultivada em um meio contendo uma fonte de

carbono sob condições eficazes para expressar o polipeptídeo. O gene *yijP* pode ser flanqueados por genes em ambos os lados. Em um aspecto relacionado, a inserção do transpóson no gene *yijP* resulta em inativação do gene *yijP* ou um polinucleotídeo do mesmo, que afeta um ou mais dos genes que flanqueiam o gene *yijP*, sendo que o gene ou genes que flanqueiam codificam para um polipeptídeo que afeta a produção de uma composição de derivado de ácido graxo quando a célula hospedeira é cultivada em um meio contendo uma fonte de carbono sob condições eficazes para expressar o polipeptídeo. Em um aspecto relacionado, o gene que flanqueia inclui polinucleotídeos que incluem, mas não se limitam a, *ppc*, *yijO*, *frwD*, *pflC*, *pflD* ou *argE*.

[0013] Outro aspecto da revelação fornece uma célula hospedeira recombinante incluindo uma sequência de polinucleotídeos geneticamente modificada que codifica um polipeptídeo de fosfoenolpiruvato carboxilase (*ppc*), sendo que a célula hospedeira recombinante produz uma composição de derivado de ácido graxo a uma titulação, rendimento ou produtividade maior do que uma célula hospedeira do tipo selvagem correspondente quando cultivada em um meio contendo uma fonte de carbono sob condições eficazes para expressar o polipeptídeo *ppc*.

[0014] Ainda assim, outro aspecto da revelação fornece uma cultura celular que inclui qualquer uma dentre as células hospedeiras recombinantes apresentadas no presente documento (supra). A célula hospedeira recombinante é cultivada em um meio de forma que a célula hospedeira recombinante produza composições derivadas de ácidos graxos de acordo com os métodos de engenharia

genética apresentados no presente documento (supra). Em um aspecto relacionado, as composições derivadas de ácidos graxos produzidas pelas células hospedeiras recombinantes da presente revelação incluem, mas não se limitam a, ácidos graxos, ésteres graxos, álcoois graxos, aldeídos graxos, alcanos, olefinas terminais, olefinas internas e cetonas. Em outro aspecto relacionado, o derivado de ácido graxo é um derivado de ácido graxo C6, C8, C10, C12, C13, C14, C15, C16, C17 ou C18. Em ainda outro aspecto relacionado, o derivado de ácido graxo é um derivado de ácido graxo insaturado C10:1, C12:1, C14:1, C16:1 ou C18:1. Em um aspecto relacionado adicional, a composição de derivado de ácido graxo compreende um ou mais dentre os derivados de ácido graxo C8, C10, C12, C14, C16 e C18. As composições derivadas de ácidos graxos produzida pelas culturas celulares que contêm as células hospedeiras recombinantes da presente revelação incluem ácidos graxos, aldeídos graxos, álcoois graxos, ésteres graxos, alcanos, olefinas terminais, olefinas internas e cetonas. A revelação engloba adicionalmente composições derivadas de ácidos graxos que incluem derivados de ácido graxo que têm uma ligação dupla na posição 7 na cadeia de carbono entre C7 e C8 a partir da extremidade reduzida do álcool graxo; composições derivadas de ácidos graxos que incluem derivados de ácido graxo insaturados; composições derivadas de ácidos graxos que incluem derivados de ácido graxo saturados; e composições derivadas de ácidos graxos que incluem derivados de ácido graxo de cadeia ramificada.

[0015] A revelação contempla adicionalmente uma cultura celular que contém qualquer uma das células

hospedeiras recombinantes apresentadas no presente documento, sendo que as células hospedeiras recombinantes têm uma titulação que é pelo menos cerca de 5% maior do que a titulação da célula hospedeira do tipo selvagem correspondente quando cultivada sob as mesmas condições que as células hospedeiras recombinantes. No presente documento, as células hospedeiras recombinantes têm uma titulação de cerca de 1 g/l a cerca de 250 g/l e, mais especificamente, de cerca de 90 g/l a cerca de 120 g/l. Em um aspecto relacionado, as células hospedeiras recombinantes têm um rendimento que é de pelo menos cerca de 10% a cerca de 40%. Em um aspecto, as células hospedeiras recombinantes têm um rendimento de cerca de 25%. Ainda englobada no presente documento é uma cultura celular que contém qualquer uma das células hospedeiras recombinantes apresentadas no presente documento, sendo que a produtividade da cultura celular varia de cerca de 0,7 mg/l/h a cerca de 3 g/l/h ou maior.

[0016] Outro aspecto da revelação fornece métodos para produzir uma célula hospedeira recombinante incluindo projetar por engenharia genética a célula hospedeira recombinante de forma que a célula expresse uma sequência de polipeptídeo que é codificada por uma ou mais sequências de polinucleotídeos sob condições específicas de cultura, sendo que a sequência de polinucleotídeos codifica para um ou mais polipeptídeos que têm uma atividade enzimática específica.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0017] A presente revelação é melhor compreendida quando lida juntamente com as Figuras anexas, que servem

para ilustrar as modalidades preferenciais. Compreende-se, entretanto, que a revelação não é limitada às modalidades específicas reveladas nas Figuras.

[0018] A Figura 1 apresenta uma trajetória biossintética exemplificativa para uso na produção de acil CoA como um precursor para derivados de ácido graxo em um microrganismo recombinante. O ciclo é iniciado pela condensação de malonil-ACP e acetil-CoA.

[0019] A Figura 2 apresenta um ciclo biossintético exemplificativo de ácido graxo, no qual malonil-ACP é produzido pela transacilação de malonil-CoA para malonil-ACP (catalisada por malonil-CoA:ACP transacilase (fabD)); e então a β -cetoacil-ACP sintase III (fabH) inicia a condensação de malonil-ACP com acetil-CoA. Os ciclos de alongamento começam com a condensação de malonil-ACP e uma acil-ACP catalisada por β -cetoacil-ACP sintase I (fabB) e por β -cetoacil-ACP sintase II (fabF) para produzir uma β -ceto-acil-ACP, então a β -ceto-acil-ACP é reduzida pela β -cetoacil-ACP redutase (fabG) para produzir uma β -hidróxi-acil-ACP, que é desidratada em uma *trans*-2-enoil-acil-ACP por β -hidroxiacil-ACP desidratase (fabA ou fabZ). A FabA pode também isomerizar *trans*-enoil-acil-ACP em *cis*-3-enoil-acil-ACP, que pode se utilizar de fabI e pode ser usado por fabB (tipicamente até um comprimento máximo de cadeia alifática de C16) para produzir β -ceto-acil-ACP. A etapa final em cada ciclo é catalisada por enoil-ACP redutase (fabI) que converte *trans*-2-enoil-acil-ACP em acil-ACP. Nos métodos descritos no presente documento, a terminação da síntese de ácido graxo ocorre por remoção de tioesterase do grupo acila a partir de acil-ACP para liberar ácidos graxos

livres (FFA). As tioesterases (por exemplo, *tesA*) hidrolisam ligações de tioéster, que ocorrem entre cadeias acila e ACP através de ligações sulfidrílicas.

[0020] A Figura 3 ilustra a estrutura e função do complexo enzimático acetil-CoA carboxilase (*accABCD*). A BirA biotinila *accB*, a proteína carreadora de carboxil-biotina, que é parte do complexo enzimático acetil-CoA carboxilase.

[0021] A Figura 4 apresenta uma visão geral de uma trajetória biossintética exemplificativa para a produção de álcool graxo iniciando com acil-ACP, em que a produção de aldeído graxo é catalisada pela atividade enzimática de acil-ACP redutase (AAR) ou tioesterase (TE) e ácido carboxílico redutase (Car). O aldeído graxo é convertido em álcool graxo por aldeído redutase (também chamada de álcool desidrogenase).

[0022] A Figura 5 apresenta uma visão geral de duas trajetórias biossintéticas exemplificativas para a produção de ésteres graxos iniciando com acil-ACP, em que a produção de ésteres graxos é conseguida por um sistema de uma enzima ou um sistema de três enzimas.

[0023] A Figura 6 apresenta uma visão geral de trajetórias biossintéticas exemplificativas para a produção de hidrocarbonetos iniciando com acil-ACP; sendo que a produção de olefinas internas é catalisada pela atividade enzimática de *OleABCD*; a produção de alcanos é catalisada pela conversão enzimática de aldeídos graxos em alcanos por meio de aldeído decarbonilase (ADC); e a produção de olefinas terminais é catalisada pela conversão enzimática de ácidos graxos em olefinas terminais por uma

decarboxilase.

[0024] A Figura 7 ilustra a produção do derivado de ácido graxo (Espécies Graxas Totais) pela cepa MG1655 de *E. coli* com o gene *fadE* atenuado (isto é, deletado) em comparação com a produção do derivado de ácido graxo pela *E. coli* MG1655. Os dados apresentados na Figura 7 mostram que a atenuação do gene *fadE* não afetou a produção de derivado de ácido graxo.

[0025] A Figura 8 mostra níveis de malonil-CoA em DAM1_i377 em fase logarítmica, que expressa oito construções diferentes de operação *C. glutamicum* acetil-CoA carboxilase (Acc).

[0026] A Figura 9 mostra níveis intracelulares de CoA de cadeia curta em *E. coli* DAM1_i377 na fase logarítmica que expressa construções de operação *ptrc1/3_accDACB-birA±panK*. A *accDACB+birA* é também chamada, no presente documento, de *accD+*.

[0027] A Figura 10 mostra a produção de éster metílico de ácido graxo (FAME) na cepa DV2 de *E. coli* que expressa éster sintase 9 a partir de *M. hydrocarbonoclasticus* e componentes de um complexo acetil-CoA carboxilase a partir de *C. glutamicum*.

[0028] A Figura 11 mostra a produção de álcoois graxos por *E. coli* que expressa a AAR de *Synechococcus elongatus* PCC7942 junto com o operação *accD+* a partir de *C. glutamicum* em um plasmídeo pCL. Amostras em triplicata são mostradas para as cepas *accD+*.

[0029] As Figuras 12A e 12B mostram dados para a produção de espécies graxas totais (mg/l) a partir de ensaios de placa em duplicata quando o plasmídeo

pCL_P_{trc}_tesA foi transformado em cada uma das cepas que contêm iFAB mostradas nas Figuras e uma fermentação foi desempenhada em meio FA2 com 20 horas, da indução à colheita, tanto em 32 °C (Figura 12A) quanto em 37 °C (Figura 12B).

[0030] A Figura 13 mostra a produção de FAME com DAM1 de *E. coli* com plasmídeo pDS57 e com operões fabHI integrados. Os genes fabH/I são de *Marinobacter aquaeoli* VT8 ou de *Acinetobacter baylyi* ADP1. Consulte a Tabela 7 para maiores detalhes sobre os operões fabH/I nessas cepas.

[0031] A Figura 14 mostra a produção de FAME com DAM1 de *E. coli* com plasmídeo pDS57 e diferentes configurações dos genes *C. glutamicum* acc assim como os operões fabHI integrados. As cepas contêm os genes fabH/I de *Rhodococcus opacus* ou de *Acinetobacter baylyi* ADP1. Consulte a Tabela 7 para maiores detalhes sobre os operões fabH/I e acc.

[0032] A Figura 15 mostra titulações de FAME e FFA das duas cepas *E. coli* DAM1 pDS57 com cepas de genes fabH/I integradas selecionadas dentre a Figura 13 em comparação com a cepa de controle *E. coli* DAM1 pDS57.

[0033] A Figura 16 é uma retratação diagramática do locus iFAB138 incluindo um diagrama do cassette cat-loxP-P_{T5} integrado na frente de iFAB138 (Figura 16 A); e um diagrama da região P_{T5}_iFAB138 (Figura 16B).

[0034] A Figura 17 mostra que a cepa V668, que tem os genes lph e ilvG repareados, produziu um nível maior de FFA do que EG149, que não tem nenhum dos genes repareados.

[0035] A Figura 18 é uma retratação diagramática de uma inserção de cassette de transpóson no gene yijP da cepa

LC535 (colocação de transpóson 68F11). Os promotores internos ao cassette de transpóson são mostrados e podem ter efeitos em uma expressão gênica adjacente.

[0036] A Figura 19 ilustra a produção de álcool graxo por DV2 de *E. coli* que expressa *Synechococcus elongatus* acil-ACP redutase (AAR) e que coexpressa várias proteína cianobacterianas carreadoras de acilas (ACPs). Os detalhes a respeito da fonte das ACPs são fornecidos na Tabela 12.

[0037] A Figura 20 ilustra a produção de ácido graxo com DV2 de *E. coli* que expressa tioesterase 'tesA de *E. coli* sem sequência líder e que coexpressa uma proteína cianobacteriana carreadora de acila (cACP) e *B. subtilis* sfp.

DESCRIÇÃO DETALHADA

Visão geral

[0038] A revelação é baseada, pelo menos em parte, na constatação de que a modificação de vários aspectos da trajetória biossintética do ácido graxo em uma célula hospedeira recombinante facilita a produção acentuada de derivados de ácido graxo pela célula hospedeira. A revelação se refere a composições de derivados de ácido graxo que têm características desejáveis e a métodos para produzir as mesmas. Além disso, a revelação se refere a células hospedeiras recombinantes (por exemplo, microrganismos), culturas de células hospedeiras recombinantes, métodos para produzir e usar as células hospedeiras recombinantes, por exemplo, o uso de células hospedeiras recombinantes cultivadas na produção fermentativa de derivados de ácido graxo que têm

características desejáveis.

[0039] Mais especificamente, a produção de uma composição desejada derivada de ácido graxo (por exemplo, acil-CoA, ácidos graxos, aldeídos graxos, álcoois de cadeia longa e curta, hidrocarbonetos, álcoois graxos, ésteres (por exemplo, ceras, ésteres de ácido graxo, ou ésteres graxos), olefinas terminais, olefinas internas e cetonas é acentuada modificando-se a expressão de um ou mais genes envolvidos em uma trajetória biossintética para produção, degradação e/ou secreção de ácido graxo, éster graxo, alcano, alceno, olefina ou álcool graxo. A revelação fornece células hospedeiras recombinantes que foram projetadas para fornecer uma biossíntese acentuada de ácido graxo em relação a células hospedeiras não projetadas ou nativas (por exemplo, células hospedeiras do tipo selvagem que funcionam como células de controle), o que é conseguido, por exemplo, através de melhoras na cepa. Sendo assim, a revelação identifica polinucleotídeos úteis para as células hospedeiras recombinantes, os métodos e as composições da revelação. Será reconhecido em geral que a identificação absoluta da sequência de tais polinucleotídeos não é necessária. Por exemplo, alterações em uma sequência de polinucleotídeos particular podem ser feitas e os polipeptídeo codificados podem ser triados para atividade. Tais alterações tipicamente compreendem mutações conservativas e mutações silenciosas (por exemplo, um aperfeiçoamento de códon). Os polinucleotídeos modificados ou projetados por engenharia genética e os polipeptídeos variantes codificados podem ser triados para uma função desejada incluindo, mas sem limitação a atividade

catalítica aumentada, estabilidade aumentada ou inibição diminuída (por exemplo, inibição por retroalimentação diminuída) com o uso de métodos conhecidos na técnica.

[0040] A revelação identifica atividades enzimáticas envolvidas em várias etapas (isto é, reações) das trajetórias biossintéticas do ácido graxo descritas no presente documento de acordo com o número de Classificação de Enzima (EC) e fornece polipeptídeos exemplificativos (por exemplo, enzimas) categorizados por tais números EC e polinucleotídeos exemplificativos que codificam tais polipeptídeos. Tais polipeptídeos e polinucleotídeos exemplificativos, que são identificados no presente documento por Números de Acesso e/ou Números de Identificação de Sequência (nos de ID de SEQ), são úteis para projetar trajetórias de ácido graxo em células hospedeiras parentais para obter as células hospedeiras recombinantes descritas no presente documento. Os polipeptídeos e polinucleotídeos descritos no presente documento são exemplificativos e não limitantes. As sequências de homólogos de polipeptídeos exemplificativos descritas no presente documento estão disponíveis às pessoas versadas na técnica através de vários bancos de dados (por exemplo, bancos de dados *rhw* Entrez fornecidos pelo Centro Nacional de Informações de Biotecnologia (NCBI), bancos de dados ExPasy fornecidos pelo Instituto Suíço de Bioinformática, o banco de dados BRENDA fornecido pela Universidade Técnica de Braunschweig e o banco de dados KEGG fornecido pelo Centro de Bioinformática da Universidade de Kyoto e da Universidade de Tokyo, todos os quais estão disponíveis na Internet).

DEFINIÇÕES

[0041] Conforme usado nesse relatório descritivo e nas reivindicações anexas, as formas singulares "um", "uma", "o" e "a" incluem referências plurais a menos que o contexto claramente dite o contrário. Assim, por exemplo, uma referência a "uma célula hospedeira recombinante" inclui duas ou mais tais células hospedeiras recombinantes, uma referência a "um álcool graxo" inclui um ou mais álcoois graxos ou misturas de álcoois graxos, uma referência a "uma sequência codificante de ácido nucleico" inclui uma ou mais sequências codificantes de ácido nucleico, uma referência a "uma enzima" inclui uma ou mais enzimas e similares.

[0042] Números de Acesso: Os Números de Acesso de Sequência no decorrer dessa descrição foram obtidos a partir de bancos de dados fornecidos pelo NCBI (Centro Nacional de Informações de Biotecnologia), mantido pelos Institutos Nacionais de Saúde, EUA (que são identificados no presente documento as "Números de Acesso NCBI" ou alternativamente como "Números de Acesso GenBank") e da UniProt Knowledgebase (UniProtKB) e do bancos de dados Swiss-Prot fornecido pelo Instituto Suíço de Bioinformática (que são identificados no presente documento como "Números de Acesso UniProtKB").

[0043] Números de Classificação de Enzima (EC): Os números EC são estabelecidos pelo Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), do qual a descrição está disponível no site de Nomenclatura de Enzimas IUBMB na Internet. Os números EC classificam as enzimas de acordo com a reação que

catalisam.

[0044] Conforme usado no presente documento, o termo "nucleotídeo" se refere a uma unidade monomérica de um polinucleotídeo que consiste em uma base heterocíclica, um açúcar e um ou mais grupos fosfato. As bases de ocorrência natural (guanina (G), adenina (A), citosina (C), timina (T) e uracil (U)) são tipicamente derivados de purina ou pirimidina, embora deva ser notado que análogos de base de ocorrência natural e não natural são também incluídos. O açúcar de ocorrência natural é a pentose (açúcar de cinco carbonos) desoxirribose (que forma o DNA) ou a ribose (que forma o RNA), embora deva ser compreendido que análogos de açúcar de ocorrência natural e não natural são também incluídos. Os ácidos nucleicos são tipicamente unidos através de ligações de fosfato para formar ácidos nucleicos ou polinucleotídeos, apesar de muitas outras uniões serem conhecidas na técnica (por exemplo, fosforotioatos, boranofosfatos e similares).

[0045] Conforme usado no presente documento, o termo "polinucleotídeo" se refere a um polímero de ribonucleotídeos (RNA) ou desoxirribonucleotídeos (DNA) que podem ser de fita simples ou de fita dupla e que podem conter nucleotídeos não naturais ou alterados. Os termos "polinucleotídeo", "sequência de ácido nucleico" e "sequência de nucleotídeo" são usados de forma intercambiável no presente documento para fazer referência a uma forma polimérica de nucleotídeos de qualquer comprimento, tanto de RNA quanto de DNA. Esses termos se referem à estrutura primária da molécula e, assim, incluem DNA de fita simples e de fita dupla e RNA de fita simples e

de fita dupla. Os termos incluem, como equivalentes, análogos tanto de RNA quanto de DNA feitos a partir de análogos de nucleotídeo e polinucleotídeos modificados tais como, apesar de sem limitação a, polinucleotídeos metilados e/ou capeados. O polinucleotídeo pode ser em qualquer forma incluindo mas sem limitação a plasmídeo, viral, cromossômico, EST, cDNA, mRNA e rRNA.

[0046] Conforme usado no presente documento, os termos "polipeptídeo" e "proteína" são usados de maneira intercambiável para fazer referência a um polímero de resíduos de aminoácido. O termo "polipeptídeo recombinante" se refere a um polipeptídeo que é produzido por técnicas recombinantes, sendo que um DNA ou RNA que codifica a proteína expressa é geralmente inserido em um vetor de expressão adequado que é por sua vez usado para transformar uma célula hospedeira para produzir o polipeptídeo.

[0047] Conforme usado no presente documento, o termo "homólogo" se refere a um polinucleotídeo ou um polipeptídeo que compreende uma sequência que é pelo menos cerca de 50% idêntica à sequência de polinucleotídeos ou polipeptídeos correspondente. Os polinucleotídeos ou polipeptídeos homólogos preferenciais têm sequências de polinucleotídeos ou sequências de aminoácido que têm pelo menos cerca de 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou pelo menos cerca de 99% de homologia com a sequência de aminoácido ou sequência de polinucleotídeos correspondente. Conforme usado no presente documento, os termos "homologia" de sequência e "identidade" de sequência são usados de maneira intercambiável.

[0048] Uma pessoa de habilidade comum na técnica está bem informada sobre métodos para determinar a homologia entre duas ou mais sequências. Brevemente, cálculos de "homologia" entre duas sequências podem ser efetivados conforme segue. As sequências são alinhadas para propósitos de comparação aperfeiçoada (por exemplo, intervalos podem ser introduzidos em um ou em ambos dentre uma primeira e uma segunda sequência de aminoácido ou ácido nucleico para alinhamento aperfeiçoado e sequências não homólogas podem ser ignoradas para propósitos de comparação). Em uma modalidade preferencial, o comprimento de uma primeira sequência que é alinhada para propósitos de comparação é pelo menos cerca de 30%, preferencialmente pelo menos cerca de 40%, mais preferencialmente pelo menos cerca de 50%, ainda mais preferencialmente pelo menos cerca de 60% e ainda mais preferencialmente pelo menos cerca de 70%), pelo menos cerca de 75%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 85%, pelo menos cerca de 90%), pelo menos cerca de 95% ou aproximadamente 100% do comprimento de uma segunda sequência. Os resíduos de aminoácido ou nucleotídeos em posições de aminoácido ou posições de nucleotídeo correspondentes da primeira e segunda sequências são então comparados. Quando uma posição na primeira sequência é ocupada pelo mesmo resíduo de aminoácido ou nucleotídeo que a posição correspondente na segunda sequência, então as moléculas são idênticas naquela posição. O percentual de homologia entre as duas sequências é uma função da quantidade de posições idênticas compartilhadas pelas sequências, levando em consideração a quantidade de intervalos e o comprimento de cada intervalo

que precise ser introduzido para o alinhamento aperfeiçoado das duas sequências.

[0049] A comparação das sequências e a determinação do percentual de homologia entre duas sequências podem ser conseguidas com o uso de um algoritmo matemático, tal como o BLAST (Altschul et al., J. Mol. Biol, 215(3): páginas 403 a 410 (1990)). O percentual de homologia entre duas sequências de aminoácido também pode ser determinado com o uso dos algoritmos Needleman e Wunsch que foram incorporados no programa GAP no pacote de software GCG, com o uso de uma matriz Blossum 62 ou de uma matriz PAM250 e um peso de intervalo de 16, 14, 12, 10, 8, 6 ou 4 e um peso de comprimento de 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 (Needleman e Wunsch, J. Mol. Biol., 48: páginas 444 a 453 (1970)). O percentual de homologia entre duas sequências de nucleotídeo também pode ser determinado com o uso do programa GAP no pacote de software GCG, com o uso de uma matriz NWSgapdna.CMP e um peso de intervalo de 40, 50, 60, 70 ou 80 e um peso de comprimento de 1, 2, 3, 4, 5 ou 6. Uma pessoa de habilidade comum na técnica pode efetivar cálculos iniciais de homologia e ajustar os parâmetros de algoritmo de acordo. Um conjunto de parâmetros preferencial (e aquele que um praticante deveria usar se estiver incerto sobre quais parâmetros deveriam ser aplicados para determinar se uma molécula está dentro de uma limitação de homologia das reivindicações) é uma matriz de pontuação Blossum 62 com uma penalidade de intervalo de 12, uma penalidade de extensão de intervalo de 4 e uma penalidade de intervalo de quadro de leitura de 5. Métodos adicionais de alinhamento de sequência são conhecidos dentro das técnicas de

biotecnologia (consulte, por exemplo, Rosenberg, BMC Bioinformatics, 6: 278 (2005); Altschul, et al., FEBS J., 272(20): páginas 5101 a 5109 (2005)).

[0050] Conforme usado no presente documento, a expressão "hibridiza mediante condições de baixa estringência, estringência média, estringência alta ou estringência muito alta" descreve condições para hibridização e lavagem. Orientações para efetivar reações de hibridização podem ser encontradas em Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1 a 6.3.6. Métodos aquosos e não aquosos são descritos nesta referência e ambos os métodos podem ser usados. As condições específicas de hibridização sob referência no presente documento são conforme segue: 1) Condições de hibridização de baixa estringência - cloreto de sódio 6 vezes concentrado/citrato de sódio (SSC) a aproximadamente 45 °C, depois duas lavadas em SSC 0,2 vez concentrado, SDS a 0,1% pelo menos a 50 °C (a temperatura das lavadas pode ser aumentada para 55 °C para condições de baixa estringência); 2) Condições de hibridização em estringência média ~ SSC 6 vezes concentrado a aproximadamente 45 °C, depois uma ou mais lavadas em SSC 0,2 vez concentrado, SDS a 0,1% a 60°C; 3) Condições de hibridização em estringência alta aproximadamente SSC 6 vezes concentrado a aproximadamente 45 °C, depois uma ou mais lavadas em SSC 0,2 vez concentrado, SDS a 0,1% a 65 °C; e 4) Condições de hibridização em estringência muito alta - fosfato de sódio a 0,5 M, 7% de SDS a 65 °C, depois uma ou mais lavadas em SSC 0,2 vez concentrado, SDS a 1% a 65 °C. As condições de estringência muito alta (4) são as condições preferenciais

a menos que seja especificado o contrário.

[0051] Um polipeptídeo "endógeno" se refere a um polipeptídeo codificado pelo genoma da célula hospedeira (por exemplo, pela célula microbial mãe) a partir do qual a célula recombinante é projetada ou derivada.

[0052] Um polipeptídeo "exógeno" se refere a um polipeptídeo que não é codificado pelo genoma da célula microbial mãe. Um polipeptídeo variante (isto é, mutante) é um exemplo de um polipeptídeo exógeno.

[0053] O termo "heterólogo" geralmente significa derivado de uma espécie diferente ou derivado de um organismo diferente. Conforme usado no presente documento, o mesmo se refere a uma sequência de nucleotídeo ou uma sequência de polipeptídeo que não está naturalmente presente em um organismo particular. Expressão heteróloga significa que uma proteína ou polipeptídeo é adicionada experimentalmente a uma célula que não expressa normalmente aquela proteína. Sendo assim, heterólogo se refere ao fato que uma proteína transferida era inicialmente derivada de um tipo diferente de célula ou uma espécie diferente da do recipiente. Por exemplo, uma sequência de polinucleotídeos endógenos a uma célula vegetal pode ser introduzida em uma célula hospedeira bacteriana por métodos recombinantes e o polinucleotídeo vegetal é então um polinucleotídeo heterólogo em uma célula hospedeira bacteriana recombinante.

[0054] Conforme usado no presente documento, o termo "fragmento" de um polipeptídeo se refere a uma porção menor de um polipeptídeo ou proteína de comprimento completo que varia em tamanho de quatro resíduos de

aminoácido à sequência inteira de aminoácido menos um resíduo de aminoácido. Em certas modalidades da revelação, um fragmento se refere à sequência de aminoácido inteira de um domínio de um polipeptídeo ou proteína (por exemplo, um domínio de ligação de substrato ou um domínio catalítico).

[0055] Conforme usado no presente documento, o termo "mutagênese" se refere a um processo pelo qual as informações genéticas de um organismo são alteradas de uma maneira estável. A mutagênese de uma sequência de ácido nucleico que codifica uma proteína produz uma proteína mutante. A mutagênese também se refere a alterações em sequências de ácido nucleico não codificantes que resultam em uma atividade de proteína modificada.

[0056] Conforme usado no presente documento, o termo "gene" se refere a sequências de ácido nucleico que codificam ou um produto de RNA ou um produto de proteína, se refere também a sequências de ácido nucleico unidas de forma operacional que afetam a expressão do RNA ou da proteína (por exemplo, tais sequências incluem mas não se limitam a sequências promotoras ou acentuadoras) ou sequências de ácido nucleico unidas de forma operacional que codificam sequências que afetam a expressão do RNA ou da proteína (por exemplo, tais sequências incluem mas não se limitam a sítios de ligação de ribossomos ou sequências de controle de tradução).

[0057] As sequências de controle de expressão são conhecidas na técnica e incluem, por exemplo, promotores, acentuadores, sinais de poliadenilação, terminadores de transcrição, sítios internos de entrada de ribossomos (IRES) e similares, que fornecem a expressão da sequência

de polinucleotídeos em uma célula hospedeira. As sequências de controle de expressão interagem especificamente com proteínas celulares envolvidas na transcrição (Maniatis et al., Science, 236: páginas 1237 a 1245 (1987)). As sequências de controle de expressão exemplificativas são descritas, por exemplo, em Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Vol. 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990).

[0058] Nos métodos da revelação, uma sequência de controle de expressão é unida de forma operacional a uma sequência de polinucleotídeos. Por "unida de forma operacional" quer-se dizer que uma sequência de polinucleotídeos e uma ou mais sequências de controle de expressão são conectadas de forma a permitir a expressão gênica quando as moléculas apropriadas (por exemplo, proteínas ativadoras de transcrição) são ligadas a uma ou mais sequências de controle de expressão. Os promotores unidos de forma operacional são localizados a montante da sequência de polinucleotídeos selecionada em termos da direção de transcrição e tradução. Os acentuadores unidos de forma operacional podem ser localizados a montante, dentro, ou a jusante do polinucleotídeo selecionado.

[0059] Conforme usado no presente documento, o termo "vetor" se refere a uma molécula de ácido nucleico com capacidade para transportar outro ácido nucleico, isto é, uma sequência de polinucleotídeos, ao qual foi unida. Um tipo de vetor útil é um episssomo (isto é, um ácido nucleico com capacidade de replicação extracromossômica). Os vetores úteis são aqueles com capacidade de replicação autônoma e/ou expressão de ácidos nucleicos aos quais são unidos. Os

vetores com capacidade para direcionar a expressão de genes às quais são unidos de forma operacional são chamados, no presente documento, de "vetores de expressão". Em geral, vetores de expressão úteis em técnicas de DNA recombinante são comumente na forma de "plasmídeos", o que se refere geralmente a alças circulares de DNA de fita dupla que, em sua forma de vetor, não são unidas ao cromossomo. Os termos "plasmídeo" e "vetor" são usados de maneira intercambiável no presente documento, dado que plasmídeo são a forma de vetor mais comumente usada. Entretanto, também estão incluídas outras formas de vetores de expressão que servem funções equivalentes e que, subsequentemente, se tornam conhecidas na técnica através do presente. Em algumas modalidades, um vetor recombinante compreende adicionalmente um promotor unido de forma operacional à sequência de polinucleotídeos. Em algumas modalidades, o promotor é um promotor regulado durante o desenvolvimento, específico de organela, específico de tecido, induzível, constitutivo ou específico de célula. O vetor recombinante tipicamente compreende pelo menos uma sequência incluindo (a) uma sequência de controle de expressão acoplada de forma operacional à sequência de polinucleotídeos; (b) um marcador de seleção acoplado de forma operacional à sequência de polinucleotídeos; (c) uma sequência marcadora acoplada de forma operacional à sequência de polinucleotídeos; (d) uma porção química purificadora acoplada de forma operacional à sequência de polinucleotídeos; (e) uma sequência de secreção acoplada de forma operacional à sequência de polinucleotídeos; e (f) uma sequência de alvejamento acoplada de forma operacional

à sequência de polinucleotídeos. Em certas modalidades, a sequência de nucleotídeo é incorporada de forma estável no DNA genômico da célula hospedeira e a expressão da sequência de nucleotídeo fica sob o controle de uma região promotora regulada. Os vetores de expressão descritos no presente documento incluem uma sequência de polinucleotídeos descrita no presente documento em uma forma adequada para a expressão da sequência de polinucleotídeos em uma célula hospedeira. Será percebido por pessoas versadas na técnica que o projeto do vetor de expressão pode depender de tais fatores como a escolha da célula hospedeira a ser transformada, o nível de expressão de polipeptídeo desejado, etc. Os vetores de expressão descritos no presente documento podem ser introduzidos nas células hospedeiras para produzir polipeptídeos incluindo polipeptídeos de fusão, codificados pelas sequências de polinucleotídeos conforme descrito no presente documento.

[0060] A expressão de genes que codificam polipeptídeos em procariotas, por exemplo, *E. coli*, é mais comumente desempenhada com vetores que contêm promotores constitutivos ou induzíveis que direcionam a expressão tanto de polipeptídeos de fusão quanto outros. Os vetores de fusão adicionam uma quantidade de aminoácidos a um polipeptídeo codificado nos mesmos, normalmente a uma terminação amino- ou carboxi- do polipeptídeo recombinante. Tais vetores de fusão tipicamente servem um ou mais dos três propósitos seguintes: (1) para aumentar a expressão do polipeptídeo recombinante; (2) para aumentar a solubilidade do polipeptídeo recombinante; e (3) para auxiliar na purificação do polipeptídeo recombinante agindo como um

ligante em purificação de afinidade. Comumente, em vetores de expressão de fusão, um sítio de clivagem proteolítica é introduzido na junção da porção química de fusão com o polipeptídeo recombinante. Isso possibilita a separação do polipeptídeo recombinante da porção química de fusão após a purificação do polipeptídeo de fusão. Em certas modalidades, uma sequência de polinucleotídeos da revelação é unida de forma operacional a um promotor derivado do bacteriófago T5.

[0061] Em certas modalidades, a célula hospedeira é uma célula de levedura e o vetor de expressão é um vetor de expressão de levedura. Os exemplos de vetores para expressão em levedura *S. cerevisiae* incluem pYepSec1 (Baldari et al., EMBO J., 6: páginas 229 a 234 (1987)), pMFa (Kurjan et al., Cell, 30: páginas 933 a 943 (1982)), pJRY88 (Schultz et al., Gene, 54: páginas 113 a 123 (1987)), pYES2 (Invitrogen Corp., San Diego, CA) e picZ (Invitrogen Corp., San Diego, CA).

[0062] Em outras modalidades, a célula hospedeira é uma célula de inseto e o vetor de expressão é um vetor de expressão de baculovírus. Os vetores de baculovírus disponíveis para a expressão de proteínas em células de inseto cultivadas (por exemplo, células Sf9) incluem, por exemplo, a série pAc (Smith et al., Mol. Cell Biol., 3 : páginas 2156 a 2165 (1983)) e a série pVL (Lucklow et al., Virology, 170: páginas 31 a 39 (1989)).

[0063] Em ainda outra modalidade, as sequências de polinucleotídeos descritas no presente documento podem ser expressas em células de mamíferos com o uso de um vetor de expressão de mamífero. Outros sistemas de expressão

adequados tanto para células procariotas quanto eucarióticas são bem conhecidos na técnica; consulte, por exemplo, Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edição, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989).

[0064] O termo "célula hospedeira do tipo selvagem correspondente", conforme referido no presente documento, significa uma célula que funciona como uma célula de controle. Por exemplo, se um polipeptídeo em uma célula hospedeira recombinante for positivamente regulado, então o mesmo polipeptídeo existiria em um nível inferior na célula de controle. De forma contrária, se um polipeptídeo em uma célula hospedeira recombinante for negativamente regulado, então o mesmo polipeptídeo existiria em um nível superior na célula de controle. Ademais, a "célula hospedeira recombinante ou projetada por engenharia" é um microrganismo usado para produzir um ou mais dentre os derivados de ácido graxo incluindo, por exemplo, acil-CoA, ácidos graxos, aldeídos graxos, álcoois de cadeia longa e curta, hidrocarbonetos, álcoois graxos, ésteres (por exemplo, ceras, ésteres de ácido graxo ou ésteres graxos), olefinas terminais, olefinas internas e cetonas. Em algumas modalidades, a célula hospedeira recombinante compreende um ou mais polinucleotídeos, sendo que cada polinucleotídeo codifica um polipeptídeo que tem uma atividade enzimática biossintética de ácido graxo.

[0065] Conforme usado no presente documento "acil-CoA" se refere a um aciltioéster formado entre o carbono carbonila da cadeia alquila e o grupo sulfidril da porção química 4'-fosfopantetionila da coenzima A (CoA), que tem a

fórmula $R-C(=O)S-CoA$, em que R é qualquer grupo alquila que tenha pelo menos 4 átomos de carbono.

[0066] Conforme usado no presente documento, "acil-ACP" se refere a um aciltioéster formado entre o carbono carbonila da cadeia alquila e o grupo sulfidríla da porção química fosfopanteteínica de uma proteína carreadora de acila (ACP). A porção química fosfopanteteínica é anexada pós-tradução a um resíduo de serina conservada em uma ACP pela ação da holoproteína carreadora de acila sintase (ACPS), uma fosfopanteteínil transferase. Em algumas modalidades, uma acil-ACP é um intermediário na síntese de acil-ACPs completamente saturadas. Em outras modalidades, uma acil-ACP é um intermediário na síntese de acil-ACPs insaturadas. Em algumas modalidades, a cadeia de carbono terá aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 ou 26 carbonos. Cada uma dessas acil-ACPs são substratos para enzimas que as convertem em derivados de ácido graxo.

[0067] Conforme usado no presente documento, o termo "derivado de ácido graxo" significa um "ácido graxo" ou um "derivado de ácido graxo" que pode ser chamado de um "ácido graxo ou derivado do mesmo". O termo "ácido graxo" significa um ácido carboxílico que tem a fórmula $RCOOH$. R representa um grupo alifático, preferencialmente um grupo alquila. R pode compreender entre aproximadamente 4 e aproximadamente 22 átomos de carbono. Os ácidos graxos podem ser saturados, monoinsaturados ou poli-insaturados. Um "derivado de ácido graxo" é um produto feito em parte a partir de trajetória biossintética do ácido graxo do organismo hospedeiro de produção. Os "derivados de ácido

graxo" incluem produtos feitos em parte a partir de acil-ACP ou derivados de acil-ACP. Os derivados de ácido graxo exemplificativos incluem, por exemplo, acil-CoA, ácidos graxos, aldeídos graxos, álcoois de cadeia longa e curta, álcoois graxos, hidrocarbonetos, ésteres (por exemplo, ceras, ésteres de ácido graxo ou ésteres graxos), olefinas terminais, olefinas internas e cetonas.

[0068] Uma "composição de derivado de ácido graxo", conforme referido no presente documento, é produzida por uma célula hospedeira recombinante e tipicamente compreende uma mistura de derivados de ácido graxo. Em alguns casos, a mistura inclui mais do que um tipo de produto (por exemplo, ácidos graxos e álcoois graxos, ácidos graxos e ésteres de ácido graxo ou alcanos e olefinas). Em outros casos, as composições derivadas de ácidos graxos podem compreender, por exemplo, uma mistura de álcoois graxos (ou outro derivado de ácido graxo) com várias características de comprimento, saturação e ramificação de cadeia. Em ainda outros casos, a composição de derivado de ácido graxo compreende uma mistura tanto de mais do que um tipo de produto quanto produtos com várias características de comprimento, saturação e ramificação de cadeia.

[0069] Conforme usado no presente documento, o termo "trajetória biossintética do ácido graxo" significa uma trajetória biossintética que produz ácidos graxos e derivados dos mesmos. A trajetória biossintética do ácido graxo pode incluir enzimas ou polipeptídeos adicionais com atividades enzimáticas, além dessas discutidas no presente documento, para produzir derivados de ácido graxo que têm características desejáveis.

[0070] Conforme usado no presente documento, "aldeído graxo" significa um aldeído que tem a fórmula $RCHO$ caracterizada por um grupo carbonila ($C=O$). Em algumas modalidades, o aldeído graxo é qualquer aldeído feito a partir de um álcool graxo. Em certas modalidades, o grupo R tem pelo menos 5, pelo menos 6, pelo menos 7, pelo menos 8, pelo menos 9, pelo menos 10, pelo menos 11, pelo menos 12, pelo menos 13, pelo menos 14, pelo menos 15, pelo menos 16, pelo menos 17, pelo menos 18, ou pelo menos 19, carbonos de comprimento. Alternativamente ou adicionalmente, o grupo R tem 20 ou menos, 19 ou menos, 18 ou menos, 17 ou menos, 16 ou menos, 15 ou menos, 14 ou menos, 13 ou menos, 12 ou menos, 11 ou menos, 10 ou menos, 9 ou menos, 8 ou menos, 7 ou menos, ou 6 ou menos carbonos de comprimento. Assim, o grupo R pode ter um grupo R ligado por dois dos pontos de extremidade acima. Por exemplo, o grupo R pode ter de 6 a 16 carbonos de comprimento, de 10 a 14 carbonos de comprimento ou de 12 a 18 carbonos de comprimento. Em algumas modalidades, o aldeído graxo é um aldeído graxo C6, C7, C8, C9, C10, C11, C12, C13, C14, C15, C16, C17, C18, C19, C20, C21, C22, C23, C24, C25 ou C26. Em certas modalidades, o aldeído graxo é um aldeído graxo C6, C7, C8, C9, C10, C11, C12, C13, C14, C15, C16, C17 ou C18.

[0071] Conforme usado no presente documento, "álcool graxo" significa um álcool que tem a fórmula ROH . Em algumas modalidades, o grupo R tem pelo menos 5, pelo menos 6, pelo menos 7, pelo menos 8, pelo menos 9, pelo menos 10, pelo menos 11, pelo menos 12, pelo menos 13, pelo menos 14, pelo menos 15, pelo menos 16, pelo menos 17, pelo menos 18 ou pelo menos 19 carbonos de comprimento.

Alternativamente ou adicionalmente, o grupo R tem 20 ou menos, 19 ou menos, 18 ou menos, 17 ou menos, 16 ou menos, 15 ou menos, 14 ou menos, 13 ou menos, 12 ou menos, 11 ou menos, 10 ou menos, 9 ou menos, 8 ou menos, 7 ou menos, ou 6 ou menos carbonos de comprimento. Assim, o grupo R pode ter um grupo R ligado por qualquer um dentre os dois pontos de extremidade acima. Por exemplo, o grupo R pode ter de 6 a 16 carbonos de comprimento, de 10 a 14 carbonos de comprimento ou de 12 a 18 carbonos de comprimento. Em algumas modalidades, o álcool graxo é um álcool graxo C6, C7, C8, C9, C10, C11, C12, C13, C14, C15, C16, C17, C18, C19, C20, C21, C22, C23, C24, C25 ou um C26. Em certas modalidades, o álcool graxo é um álcool graxo C6, C7, C8, C9, C10, C11, C12, C13, C14, C15, C16, C17 ou C18.

[0072] O grupo R de um derivado de ácido graxo, por exemplo, um álcool graxo, pode ser de uma cadeia linear ou uma cadeia ramificada. As cadeias ramificadas podem ter mais do que um ponto de ramificação e podem incluir ramificações cíclicas. Em algumas modalidades, o ácido graxo ramificado, aldeído graxo ramificado ou álcool graxo ramificado é um ácido graxo ramificado, aldeído graxo ramificado ou álcool graxo ramificado C6, C7, C8, C9, C10, C11, C12, C13, C14, C15, C16, C17, C18, C19, C20, C21, C22, C23, C24, C25 ou C26. Em modalidades particulares, o ácido graxo ramificado, aldeído graxo ramificado ou álcool graxo ramificado é um ácido graxo ramificado, aldeído graxo ramificado, ou álcool graxo ramificado C6, C7, C8, C9, C10, C11, C12, C13, C14, C15, C16, C17 ou C18. Em certas modalidades, o grupo hidroxila do ácido graxo ramificado, aldeído graxo ramificado ou álcool graxo ramificado está na

posição primária (C1).

[0073] Em certas modalidades, o derivado de ácido graxo ramificado é um isoderivado de ácido graxo, por exemplo um iso-aldeído graxo, um iso-álcool graxo, ou um anteisoderivado de ácido graxo, um anteiso-aldeído graxo ou um anteiso-álcool graxo. Em modalidades exemplificativas, o derivado de ácido graxo ramificado é selecionado dentre os álcoois graxos ramificados iso-C7:0, iso-C8:0, iso-C9:0, iso-C10:0, iso-C11:0, iso-C12:0, iso-C13 :0, iso-C14:0, iso-C15:0, iso-C16:0, iso-C17:0, iso-C18:0, iso-C19:0, anteiso-C7:0, anteiso-C8:0, anteiso-C9:0, anteiso-C10:0, anteiso-C11 :0, anteiso-C12:0, anteiso-C13:0, anteiso-C14:0, anteiso-C15:0, anteiso-C16:0, anteiso-C17:0, anteiso-C18:0 e um anteiso-C19:0.

[0074] O grupo R de um derivado de ácido graxo ramificado ou não ramificado pode ser saturado ou insaturado. Se insaturado, o grupo R pode ter um ou mais do que um ponto de insaturação. Em algumas modalidades, o derivado de ácido graxo insaturado é um derivado de ácido graxo monoinsaturado. Em certas modalidades, o derivado de ácido graxo insaturado é um derivado de ácido graxo insaturado C6:1, C7:1, C8:1, C9:1, C10:1, C11:1, C12:1, C13:1, C14:1, C15:1, C16:1, C17:1, C18:1, C19:1, C20:1, C21:1, C22:1, C23:1, C24:1, C25:1, ou um C26:1. Em certas modalidades, o derivado de ácido graxo insaturado é um derivado de ácido graxo insaturado C10:1, C12:1, C14:1, C16:1 ou C18:1. Em outras modalidades, o derivado de ácido graxo insaturado é insaturado na posição ômega-7. Em certas modalidades, o derivado de ácido graxo insaturado compreende uma ligação cis dupla.

[0075] Conforme usado no presente documento, o termo "clone" tipicamente se refere a uma célula ou grupo de células descendidas de e geneticamente essencialmente idênticas a um ancestral comum único, por exemplo, bactérias de uma colônia bacteriana clonada tenham surgido de uma única célula bacteriana.

[0076] Conforme usado no presente documento, o termo "cultura" tipicamente se refere a um meio líquido que compreende células viáveis. Em uma modalidade, uma cultura compreende células que se reproduzem em um meio de cultura predeterminado sob condições controladas, por exemplo, uma cultura de células hospedeiras recombinantes desenvolvidas em um meio líquido que compreende uma fonte de carbono e nitrogênio selecionada. "Desenvolvimento em cultura" ou "cultivação" se referem a desenvolver uma população de células hospedeiras recombinantes sob condições adequadas em um meio líquido ou sólido. Em modalidades particulares, desenvolvimento em cultura se refere à bioconversão fermentativa de um substrato em um produto final. Os meios de desenvolvimento em cultura são bem conhecidos e componentes individuais de tais meios de cultura estão disponíveis junto a fontes comerciais, por exemplo, sob as marcas comerciais Difco™ e BBL™. Em um exemplo não limitante, o meio nutriente aquoso é um "meio rico" que compreende fontes complexas de nitrogênio, sais e carbono, tais como o meio YP, que compreende 10 g/l de peptona e 10 g/l de extrato de levedura de tal meio. A célula hospedeira de uma cultura pode ser adicionalmente projetada por engenharia para assimilar o carbono de forma eficiente e usar materiais celulósicos como fontes de carbono de acordo

com métodos descritos nas Patentes nº US 5.000,000; 5.028.539; 5.424.202; 5.482.846; 5.602.030; WO 2010127318. Adicionalmente, em algumas modalidades, a célula hospedeira é projetada por engenharia para expressar uma invertase de forma que a sacarose possa ser usada como uma fonte de carbono.

[0077] Conforme usado no presente documento, o termo "sob condições eficazes para expressar uma sequência de polinucleotídeos geneticamente modificada" significa qualquer condição que permita a uma célula hospedeira produzir um derivado de ácido graxo desejado. As condições adequadas incluem, por exemplo, condições de fermentação.

[0078] Conforme usado no presente documento, um "nível de atividade alterado" ou "modificado" de uma proteína, por exemplo, uma enzima, em uma célula hospedeira recombinante, se refere a uma diferença em uma ou mais características na atividade determinada em relação à célula hospedeira mãe ou nativa. Tipicamente, as diferenças na atividade são determinadas entre uma célula hospedeira recombinante, que tem uma atividade modificada, e a correspondente célula hospedeira de tipo selvagem (por exemplo, uma comparação de uma cultura de uma célula hospedeira recombinante em relação à célula hospedeira de tipo selvagem correspondente). Atividades modificadas podem ser o resultado, por exemplo, de quantidades modificadas de proteína expressas por uma célula hospedeira recombinante (por exemplo, como o resultado de uma quantidade aumentada ou diminuída de cópias de sequências de DNA que codificam a proteína, quantidade aumentada ou diminuída de transcritos de mRNA que codificam a proteína e/ou quantidades

aumentadas ou diminuídas de tradução de proteína da proteína a partir de mRNA); alterações na estrutura da proteína (por exemplo, alterações na estrutura primária, tais como alterações a uma sequência codificadora de proteína que resulta em alterações na especificidade de substrato, alterações em parâmetros cinéticos observados); e alterações na estabilidade de proteína (por exemplo, degradação de proteína aumentada ou diminuída). Em algumas modalidades, o polipeptídeo é um mutante ou um variante de qualquer um dentre os polipeptídeos descritos no presente documento. Em determinados casos, as sequências codificantes para os polipeptídeos descritos no presente documento são códons aperfeiçoados para a expressão em uma célula hospedeira particular. Por exemplo, para a expressão em *E. coli*, um ou mais códons podem ser aperfeiçoados conforme descrito, por exemplo, em Grosjean et al., Gene 18:páginas 199 a 209 (1982).

[0079] O termo "sequências reguladoras", conforme usado no presente documento, tipicamente se refere a uma sequência de bases em DNA unidas de forma operacional a sequências de DNA que codificam uma proteína que, por fim, controla a expressão da proteína. Exemplos de sequências reguladoras incluem, mas não se limitam a, sequências promotoras de RNA, sequências de união de fator de transcrição, sequências de terminação de transcrição, moduladores de transcrição (tais como elementos acentuadores), sequências de nucleotídeo que afetam a estabilidade de RNA e sequências reguladoras de tradução (tais como sítios de união de ribossomos (por exemplo, sequências Shine-Dalgarno em procariotas ou sequências

Kozak em eucariotas), códons de iniciação e códons de terminação).

[0080] Os termos "nível de expressão alterado" e "nível de expressão modificado" são usados de maneira intercambiável e significam que um polinucleotídeo, polipeptídeo ou hidrocarboneto está presente em uma concentração diferente em uma célula hospedeira projetada por engenharia em comparação com sua concentração em uma célula de tipo selvagem correspondente sob as mesmas condições.

[0081] Conforme usado no presente documento, o termo "titulação" se refere à quantidade de derivado de ácido graxo produzida por volume de unidade de cultura de célula hospedeira. Em qualquer aspecto das composições e métodos descritos no presente documento, um derivado de ácido graxo é produzido em uma titulação de cerca de 25 mg/l, aproximadamente 50 mg/l, aproximadamente 75 mg/l, aproximadamente 100 mg/l, aproximadamente 125 mg/l, aproximadamente 150 mg/l, aproximadamente 175 mg/l, aproximadamente 200 mg/l, aproximadamente 225 mg/l, aproximadamente 250 mg/l, aproximadamente 275 mg/l, aproximadamente 300 mg/l, aproximadamente 325 mg/l, aproximadamente 350 mg/l, aproximadamente 375 mg/l, aproximadamente 400 mg/l, aproximadamente 425 mg/l, aproximadamente 450 mg/l, aproximadamente 475 mg/l, aproximadamente 500 mg/l, aproximadamente 525 mg/l, aproximadamente 550 mg/l, aproximadamente 575 mg/l, aproximadamente 600 mg/l, aproximadamente 625 mg/l, aproximadamente 650 mg/l, aproximadamente 675 mg/l, aproximadamente 700 mg/l, aproximadamente 725 mg/l,

aproximadamente 750 mg/l, aproximadamente 775 mg/l,
aproximadamente 800 mg/l, aproximadamente 825 mg/l,
aproximadamente 850 mg/l, aproximadamente 875 mg/l,
aproximadamente 900 mg/l, aproximadamente 925 mg/l,
aproximadamente 950 mg/l, aproximadamente 975 mg/l,
aproximadamente 1.000 mg/l, aproximadamente 1.050 mg/l,
aproximadamente 1.075 mg/l, aproximadamente 1.100 mg/l,
aproximadamente 1.125 mg/l, aproximadamente 1.150 mg/l,
aproximadamente 1.175 mg/l, aproximadamente 1.200 mg/l,
aproximadamente 1.225 mg/l, aproximadamente 1.250 mg/l,
aproximadamente 1.275 mg/l, aproximadamente 1.300 mg/l,
aproximadamente 1.325 mg/l, aproximadamente 1.350 mg/l,
aproximadamente 1.375 mg/l, aproximadamente 1.400 mg/l,
aproximadamente 1.425 mg/l, aproximadamente 1.450 mg/l,
aproximadamente 1.475 mg/l, aproximadamente 1.500 mg/l,
aproximadamente 1.525 mg/l, aproximadamente 1.550 mg/l,
aproximadamente 1.575 mg/l, aproximadamente 1.600 mg/l,
aproximadamente 1.625 mg/l, aproximadamente 1.650 mg/l,
aproximadamente 1.675 mg/l, aproximadamente 1.700 mg/l,
aproximadamente 1.725 mg/l, aproximadamente 1.750 mg/l,
aproximadamente 1.775 mg/l, aproximadamente 1.800 mg/l,
aproximadamente 1.825 mg/l, aproximadamente 1.850 mg/l,
aproximadamente 1.875 mg/l, aproximadamente 1.900 mg/l,
aproximadamente 1.925 mg/l, aproximadamente 1.950 mg/l,
aproximadamente 1.975 mg/l, aproximadamente 2.000 mg/l
(2g/l), 3 g/l, 5 g/l, 10 g/l, 20 g/l, 30 g/l, 40 g/l, 50
g/l, 60 g/l, 70 g/l, 80 g/l, 90 g/l, 100 g/l ou uma faixa
ligada por dois valores quaisquer dentre os antecedentes.
Em outras modalidades, um derivado de ácido graxo é
produzido em uma titulação de mais do que 100g/l, mais do

que 200g/l, mais do que 300g/l ou maior, tal como 500 g/l, 700 g/l, 1.000 g/l, 1.200 g/l, 1.500 g/l ou 2.000 g/l. A titulação preferencial de derivado de ácido graxo produzido por uma célula hospedeira recombinante de acordo com os métodos da revelação é a partir de 5 g/l a 200 g/l, de 10 g/l a 150 g/l, de 20 g/l a 120 g/l e de 30 g/l a 100 g/l. Em uma modalidade, a titulação de derivado de ácido graxo produzido por uma célula hospedeira recombinante de acordo com os métodos da revelação é de aproximadamente 1 g/l a cerca de 250 g/l e mais particularmente de 90 g/l a cerca de 120 g/l. A titulação pode se referir a um derivado particular de ácido graxo ou a uma combinação de derivados de ácido graxo produzidos por uma dada cultura de célula hospedeira recombinante.

[0082] Conforme usado no presente documento, o "rendimento de derivado de ácido graxo produzido por uma célula hospedeira" se refere à eficiência com a qual uma fonte de carbono de entrada é convertida em produto (isto é, álcool graxo ou aldeído graxo) em uma célula hospedeira. As células hospedeiras projetadas por engenharia para produzir derivados de ácido graxo de acordo com os métodos da revelação têm um rendimento de pelo menos 3%, pelo menos 4%, pelo menos 5%, pelo menos 6%, pelo menos 7%, pelo menos 8%, pelo menos 9%, pelo menos 10%, pelo menos 11%, pelo menos 12%, pelo menos 13%, pelo menos 14%, pelo menos 15%, pelo menos 16%, pelo menos 17%, pelo menos 18%, pelo menos 19%, pelo menos 20%, pelo menos 21%, pelo menos 22%, pelo menos 23%, pelo menos 24%, pelo menos 25%, pelo menos 26%, pelo menos 27%, pelo menos 28%, pelo menos 29%, ou pelo menos 30% ou uma faixa limitada por dois dentre os valores

anteriores. Em outras modalidades, derivados ou derivados de ácido graxo são produzidos em um rendimento de mais do que 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou mais. Alternativamente ou adicionalmente, o rendimento é de aproximadamente 30% ou menos, aproximadamente 27% ou menos, aproximadamente 25% ou menos, ou aproximadamente 22% ou menos. Assim, o rendimento pode ser limitado por quaisquer um dos pontos de extremidade acima. Por exemplo, o rendimento de derivados ou derivados de ácido graxo produzidos pela célula hospedeira recombinante de acordo com os métodos da revelação pode ser de 5% a 15%, 10% a 25%, de 10% a 22%, de 15% a 27%, de 18% a 22%, de 20% a 28% ou de 20% a 30%. Em uma modalidade particular, o rendimento de derivados ou derivados de ácido graxo produzidos pela célula hospedeira recombinante é aproximadamente de 10% a cerca de 40%. Em outra modalidade particular, o rendimento de derivados ou derivados de ácido graxo produzidos pela célula hospedeira recombinante é de aproximadamente 25%. O rendimento pode se referir a um derivado particular de ácido graxo ou a uma combinação de derivados de ácido graxo produzidos por uma dada cultura de célula hospedeira recombinante.

[0083] Conforme usado no presente documento, o termo "produtividade" se refere à quantidade de derivados ou derivados de ácido graxo produzida por unidade de volume de cultura de célula hospedeira por unidade de tempo. Em qualquer aspecto das composições e métodos descritos no presente documento, a produtividade de derivados ou derivados de ácido graxo produzidos por uma célula hospedeira recombinante é de pelo menos 100 mg/l/hora, pelo

menos 200 mg/l/hora, pelo menos 300 mg/l/hora, pelo menos 400 mg/l/hora, pelo menos 500 mg/l/hora, pelo menos 600 mg/l/hora, pelo menos 700 mg/l/hora, pelo menos 800 mg/l/hora, pelo menos 900 mg/l/hora, pelo menos 1.000 mg/l/hora, pelo menos 1.100 mg/l/hora, pelo menos 1.200 mg/l/hora, pelo menos 1.300 mg/l/hora, pelo menos 1.400 mg/l/hora, pelo menos 1.500 mg/l/hora, pelo menos 1.600 mg/l/hora, pelo menos 1.700 mg/l/hora, pelo menos 1.800 mg/l/hora, pelo menos 1.900 mg/l/hora, pelo menos 2.000 mg/l/hora, pelo menos 2.100 mg/l/hora, pelo menos 2.200 mg/l/hora, pelo menos 2.300 mg/l/hora, pelo menos 2.400 mg/l/hora ou pelo menos 2.500 mg/l/hora. Por exemplo, a produtividade de derivados ou derivados de ácido graxo produzidos por uma célula hospedeira recombinante de acordo com os métodos da invenção pode ser a partir de 500 mg/l/hora a 2500 mg/l/hora ou a partir de 700 mg/l/hora a 2.000 mg/l/hora. Em uma modalidade particular, o rendimento é de aproximadamente 0,7 mg/l/h a cerca de 3 g/l/h. A produtividade pode se referir a um derivado particular de ácido graxo ou a uma combinação de derivados de ácido graxo produzidos por uma dada cultura de célula hospedeira recombinante.

[0084] Conforme usado no presente documento, os termos "espécies graxas totais" e "produto total de ácido graxo" podem ser usados de maneira intercambiável no presente documento como uma referência à quantidade de álcoois graxos, aldeídos graxos e ácidos graxos conforme avaliado por GC-FID conforme descrito no Pedido de Patente Internacional W02008/119082. Os mesmos termos podem ser usados para significar ésteres graxos e ácidos graxos

livres quando em referência a uma análise de éster graxo.

[0085] Conforme usado no presente documento, o termo "taxa de utilização de glicose" significa a quantidade de glicose usada pela cultura por unidade de tempo, relatado como gramas/litro/hora (g/l/h). Conforme usado no presente documento, o termo "fonte de carbono" se refere a um substrato ou composto adequado para ser usado como uma fonte de carbono para crescimento celular procariótico ou eucariótico simples. As fontes de carbono podem ser em várias formas incluindo, mas não se limitam a polímeros, carboidratos, ácidos, álcoois, aldeídos, cetonas, aminoácidos, peptídeos e fases (por exemplo, CO e CO₂). As fontes de carbono exemplificativas incluem, mas não se limitam a, monossacarídeos, tais como a glicose, a frutose, a manose, galactose, xilose e arabinose; oligossacarídeos, tais como frutoligossacarídeo e galactoligossacarídeo; polissacarídeos tais como amido, celulose, pectina e xilano; dissacarídeos, tais como sacarose, maltose, celobiose e turanose; material celulósico e variantes tais como hemiceluloses, metilcelulose e carboximetilcelulose; ácidos graxos saturados ou insaturados, succinato, lactato e acetato; álcoois, tais como etanol, metanol e glicerol, ou misturas dos mesmos. A fonte de carbono pode ser também um produto de fotossíntese, tal como glicose. Em certas modalidades preferenciais, a fonte de carbono é a biomassa. Em outras modalidades preferenciais, a fonte de carbono é glicose. Em outras modalidades preferenciais a fonte de carbono é sacarose.

[0086] Conforme usado no presente documento, o

termo "biomassa" se refere a qualquer material biológico a partir do qual uma fonte de carbono é derivada. Em algumas modalidades, uma biomassa é processada e se torna uma fonte de carbono, que é adequada para bioconversão. Em outras modalidades, a biomassa não necessita de processamento adicional para se tornar uma fonte de carbono. A fonte de carbono pode ser convertida e se tornar um biocombustível. Uma fonte de biomassa exemplificativa é matéria vegetal ou vegetação, tal como milho, cana de açúcar ou *Panicum virgatum*. Outra fonte de biomassa exemplificativa são os produtos residuais metabólicos, tais como matéria animal (por exemplo, estrume de vaca). Além disso, fontes exemplificativas de biomassa incluem algas e outras plantas marinhas. A biomassa também pode incluir produtos residuais de indústrias, de agricultura, de silvicultura e de domicílios incluindo, mas sem limitação a resíduos de fermentação, ensilagem, palha, lenha, despejos de esgoto, lixo, resíduos urbanos celulósicos e restos de comida. O termo "biomassa" também se refere a fontes de carbono tais como carboidratos (por exemplo, monossacarídeos, dissacarídeos ou polissacarídeos).

[0087] Conforme usado no presente documento, o termo "isolada(o)", com relação a produtos (tais como ácidos graxos e derivados dos mesmos), se refere a produtos que são separados de componentes celulares, de meios de cultura celular ou de precursores químicos ou sintéticos. Os ácidos graxos e derivados dos mesmos produzidos pelos métodos descritos no presente documento podem ser relativamente imiscíveis no caldo de fermentação, assim como no citoplasma. Portanto, os ácidos graxos e derivados

dos mesmos podem ser coletados em uma fase orgânica tanto de forma intracelular quanto de forma extracelular.

[0088] Conforme usado no presente documento, os termos "purificar", "purificado" e "purificação" significam a remoção ou o isolamento de uma molécula de seu ambiente, por exemplo, por isolamento ou separação. As moléculas "substancialmente purificadas" são pelo menos cerca de 60% livres (por exemplo, pelo menos cerca de 70% livres, pelo menos cerca de 75% livres, pelo menos cerca de 85% livres, pelo menos cerca de 90% livres, pelo menos cerca de 95% livres, pelo menos cerca de 97% livres, pelo menos cerca de 99% livres) de outros componentes com os quais são associadas. Conforme usado no presente documento, esses termos também se referem à remoção de contaminantes de uma amostra. Por exemplo, a remoção de contaminantes pode resultar em um aumento na porcentagem de derivados de ácido graxo em uma amostra. Por exemplo, quando um derivado de ácido graxo é produzido em uma célula hospedeira recombinante, o derivado de ácido graxo pode ser purificado pela remoção de proteínas de célula hospedeira. Após a purificação, a porcentagem do derivado de ácido graxo na amostra é aumentada. Os termos "purificar", "purificado" e "purificação" são termos relativos que não necessitam de pureza absoluta. Assim, por exemplo, quando um derivado de ácido graxo é produzido em células hospedeiras recombinantes, um derivado de ácido graxo purificado é um derivado de ácido graxo que é substancialmente separado de outros componentes celulares (por exemplo, ácidos nucleicos, polipeptídeos, lipídeos, carboidratos ou outros hidrocarbonetos).

MELHORAS NA CEPA

[0089] A fim de gerar uma alta titulação, rendimento, e/ou produtividade de derivados de ácido graxo, várias modificações foram feitas à produção de células hospedeiras. A FadR é um fator regulador chave envolvido na degradação de ácido graxo e nas trajetórias biossintetizantes de ácido graxo (Cronan et al, Mol Microbiol, 29(4): páginas 937 a 943 (1998)). A FadD de enzima ACS de *E. Coli* e a proteína de transporte de ácido graxo FadL são componentes de um sistema de captação de ácido graxo. A FadL media o transporte de ácidos graxos para dentro da célula bacteriana e a FadD media a formação de ésteres de acil-CoA. Quando nenhuma outra fonte de carbono estiver disponível, ácidos graxos exógenos são tomados por bactérias e convertidos em ésteres de acil-CoA, que podem se ligar ao fator de transcrição FadR e deprimir a expressão de genes *fad* que codificam as proteínas responsáveis por transporte (FadL), ativação (FadD), e β -oxidação (FadA, FadB, FadE e FadH) de ácido graxo. Quando fontes de carbono alternativas estão disponíveis, as bactérias sintetizam os ácidos graxos como acil-ACPs, que são usados para síntese fosfolipídica, mas não são substratos para β -oxidação. Assim, acil-CoA e acil-ACP são ambas fontes independentes de ácidos graxos que podem resultar em diferentes produtos finais (Caviglia et al, J Biol. Chem., 279(12): páginas 1163 a 1169 (2004)).

[0090] Há especulações conflitantes na técnica quanto aos fatores que podem limitar a biossíntese de ácido graxo em células hospedeiras, tais como *E. coli*. Uma sugestão é que uma limitação dos precursores principais

para a biossíntese de ácido graxo, por exemplo, acetil-CoA e malonil-CoA, pode resultar na síntese diminuída de derivados de ácido graxo. Uma abordagem para aumentar o fluxo através de biossíntese de ácido graxo é manipular várias enzimas na trajetória (consulte Figuras 1 e 2). O Exemplo 3 descreve estudos que mostram a construção de operões *fab* que codificam enzimas na trajetória biossintética para a conversão de malonil-CoA em acil-ACPs e para a integração dentro de um cromossomo de uma célula hospedeira de *E. coli*. Sem desejo de se prender à teoria, isso pode aumentar o fluxo da biossíntese de ácido graxo. O provimento de acil-ACPs a partir de acetil-CoA através do complexo acetil-CoA carboxilase (*acc*) e da trajetória biossintética de ácido graxo (*fab*) é outra etapa que pode limitar a taxa de produção de derivado de ácido graxo (consulte Figura 3). O Exemplo 2 mostra que o efeito de superexpressão de uma versão aperfeiçoada de *accABCD* ($\pm$ *birA*) de *E. coli Corynebacterium glutamicum* demonstrou que tais modificações genéticas podem levar à produção aumentada de acetil-coA e malonil-CoA em *E. coli*.

[0091] Em outra abordagem, mostrou-se que as mutações nos genes *rph* e *ilvG* na célula hospedeira de *E. coli* resultaram em maior produção de ácidos graxos livres (FFA), o que se traduziu em uma maior produção de álcool graxo conforme mostrado no Exemplo 4. Em ainda outra abordagem, a mutagênese de transpóson e a triagem de alta vazão agregaram valor em prol da constatação de mutações benéficas que aumentam a titulação ou o rendimento. Conforme mostrado no Exemplo 5, uma inserção de transpóson no gene *yijP* pode melhorar o rendimento de álcool graxo em

fermentações de frasco de agitação e de batelada alimentada.

Geração de Derivados de Ácido Graxo por Células Hospedeiras Recombinantes

[0092] A presente revelação fornece numerosos exemplos de polipeptídeos (isto é, enzimas) que têm atividades adequadas para o uso nas trajetórias biossintetizantes de ácido graxo descritas no presente documento. Tais polipeptídeos são coletivamente chamados, no presente documento, de "polipeptídeos biossintéticos de ácido graxo" ou "enzimas biossintetizantes de ácido graxo". Exemplos não limitantes de polipeptídeos de trajetória de ácido graxo adequados para o uso em células hospedeiras recombinantes da revelação são fornecidos no presente documento. Em algumas modalidades, a revelação inclui uma célula hospedeira recombinante incluindo uma sequência de polinucleotídeos que codifica um polipeptídeo biossintetizante de ácido graxo. A sequência de polinucleotídeos, que inclui um quadro de leitura aberto que codifica um polipeptídeo biossintetizante de ácido graxo e sequências reguladoras unidas de forma operacional, pode ser integrada em um cromossomo das células hospedeiras recombinantes, incorporada em um ou mais sistemas de expressão de plasmídeo residentes na célula hospedeira recombinante, ou em ambos. Em uma modalidade, uma sequência de polinucleotídeos biossintética de ácido graxo codifica um polipeptídeo que é endógeno à célula hospedeira mãe (isto é, a célula de controle) da célula hospedeira recombinante que está sendo projetada por engenharia. Alguns tais polipeptídeos endógenos são superexpressos na

célula hospedeira recombinante. Em outra modalidade, a sequência de polinucleotídeos biossintética de ácido graxo codifica um polipeptídeo exógeno ou heterólogo. Em outras palavras, o polipeptídeo codificado pelo polinucleotídeo é exógeno à célula hospedeira mãe. Em ainda outra modalidade, a célula hospedeira geneticamente modificada superespressa um gene que codifica um polipeptídeo (proteína) que aumenta a taxa na qual a célula hospedeira produz o substrato de uma enzima biossintética de ácido graxo, isto é, um substrato aciltioéster graxo. Em certas modalidades, a enzima codificada pelo gene expresso é diretamente envolvida em biossíntese de ácido graxo. Tais células hospedeiras recombinantes podem ser adicionalmente projetadas por engenharia para incluir uma sequência de polinucleotídeos que codifica um ou mais polipeptídeos biossintéticos de ácido graxo (isto é, enzimas envolvidas na biossíntese de ácido graxo). Exemplos de tais polipeptídeos são polipeptídeos ou proteínas que têm a atividade de tioesterase, sendo que a célula hospedeira recombinante sintetiza ácidos graxos; ou que têm a atividade de tioesterase e a atividade de ácido carboxílico redutase (CAR), sendo que a célula hospedeira recombinante sintetiza aldeídos graxos e álcoois graxos; ou que têm atividade de tioesterase, atividade de ácido carboxílico redutase e atividade de álcool desidrogenase sendo que a célula hospedeira recombinante sintetiza álcoois graxos; ou que têm atividade de acil-CoA redutase (AAR) sendo que a célula hospedeira recombinante sintetiza aldeídos graxos e álcoois graxos; ou que têm atividade de acil-CoA redutase (AAR) e atividade de álcool desidrogenase sendo que a

célula hospedeira recombinante sintetiza álcoois graxos; ou que têm atividade de acil-CoA redutase formado de álcool graxo (FAR), sendo que a célula hospedeira recombinante sintetiza álcoois graxos; ou que têm atividade de tioesterase, atividade de ácido carboxílico redutase e atividade de aldeído decarbonilase, sendo que a célula hospedeira recombinante sintetiza alcanos; ou que têm atividade de acil-CoA redutase e atividade de aldeído decarbonilase, sendo que a célula hospedeira recombinante sintetiza alcanos; ou que tem atividade de éster sintase sendo que a célula hospedeira recombinante sintetiza ésteres graxos (por exemplo, um sistema de uma enzima; consulte Figura 5); ou que têm atividade de tioesterase, atividade de acil-CoA sintase e atividade de éster sintase sendo que a célula hospedeira recombinante sintetiza ésteres graxos (por exemplo, sistema de três enzimas; consulte Figura 5); ou que tem atividade OleA, sendo que a célula hospedeira recombinante sintetiza cetonas alifáticas; ou que tem atividade OleABCD, sendo que a célula hospedeira recombinante sintetiza olefinas internas; ou que tem atividade de tioesterase e atividade de decarboxilase, sendo que a célula hospedeira recombinante sintetiza olefinas terminais; ou combinações dos mesmos. Em algumas modalidades, pelo menos um polipeptídeo codificado por um polinucleotídeo biossintetizante de ácido graxo é um polipeptídeo exógeno (ou heterólogo) (por exemplo, um polipeptídeo que se origina de um organismo outro que não o da célula hospedeira mãe, ou uma variante de um polipeptídeo nativo à célula microbial mãe) ou um polipeptídeo endógeno (isto é, um polipeptídeo nativo à

célula hospedeira mãe) sendo que o polipeptídeo endógeno é superexpresso na célula hospedeira recombinante.

[0093] A Tabela 1 abaixo fornece uma listagem de proteínas exemplificativas que podem ser expressas em células hospedeiras recombinantes para facilitar a produção de derivados particulares de ácido graxo.

Tabela 1: Nomenclaturas de Genes

Designação do Gene	Organismo - fonte	Nome da Enzima	Nº de Acesso	Número EC	Uso Exemplificativo
1. Aumento na Produção de Ácido Graxo/Aumento na Produção do Produto					
accA	<i>E. coli</i> , <i>Lactococcus i</i>	Acetil-CoA carboxilase, subunidade A (carboxiltransferase alfa)	AAC73296, NP_414727	6.4.1.2	aumento na produção de Malonil-CoA
accB	<i>E. coli</i> , <i>Lactococcus i</i>	Acetil-CoA carboxilase, subunidade B (BCCP: proteína carreadora de carboxil-biotina)	NP_417721	6.4.1.2	aumento na produção de Malonil-CoA
accC	<i>E. coli</i> , <i>Lactococcus i</i>	Acetil-CoA carboxilase, subunidade C (biotina carboxilase)	NP_41772	6.4.1.2, 6.3.4.14	aumento na produção de Malonil-CoA
accD	<i>E. coli</i> , <i>Lactococcus</i>	Acetil-CoA carboxilase,	NP_ 416819	6.4.1.2	aumento na produção de Malonil-CoA

Designação do Gene	Organismo - fonte	Nome da Enzima	Nº de Acesso	Número EC	Uso Exemplificativo
	<i>i</i>	subunidade D (carboxiltransferase beta)			
fadD	<i>E. coli</i> <i>W3110</i>	acil-CoA sintase	AP_002424	2.3.1.86, 6.2.1.3	aumento na produção de Ácido Graxo
fabA	<i>E. coli</i> <i>K12</i>	β - hidroxidecanoil tioéster desidratase/iso merase	NP_415474	4.2.1.60	aumento na produção de acila graxa- ACP/CoA
fabB	<i>E. coli</i>	3-oxoacil- [proteína carreadora de acila] sintase I	BAA16180	2.3.1.41	aumento na produção de acila graxa- ACP/CoA
fabD	<i>E. coli</i> <i>K12</i>	[proteína carreadora de acila] S- maloniltransfer ase	AAC74176	2.3.1.39	aumento na produção de acila graxa- ACP/CoA
fabF	<i>E. coli</i> <i>K12</i>	3-oxoacil- [proteína carreadora de acila] sintase II	AAC74179	2.3.1.179	aumento na produção de acila graxa- ACP/CoA
fabG	<i>E. coli</i> <i>K12</i>	3-oxoacil- [proteína	AAC74177	1.1.1.100	aumento na produção de acila graxa-

Designação do Gene	Organismo - fonte	Nome da Enzima	Nº de Acesso	Número EC	Uso Exemplificativo
		carreadora de acila] redutase			ACP/CoA
fabH	<i>E. coli</i> K12	3-oxoacil-[proteína carreadora de acila] sintase III	AAC74175	2.3.1.180	aumento na produção de acila graxa-ACP/CoA
fabI	<i>E. coli</i> K12	enoil-[proteína carreadora de acila] redutase	NP_415804	1.3.1.9	aumento na produção de acila graxa-ACP/CoA
fabR	<i>E. coli</i> K12	Repressor Transcricional	NP_418398	nenhum	produção de ácido graxo modulado insaturado
fabV	<i>Vibrio cholerae</i>	enoil-[proteína carreadora de acila] redutase	YP_001217283	1.3.1.9	aumento na produção de acila graxa-ACP/CoA
fabZ	<i>E. coli</i> K12	(3R)-hidroximiristolproteína carreadora de acila desidratase	NP_414722	4.2.1.-	aumento na produção de acila graxa-ACP/CoA
fadE	<i>E. coli</i> K13	acil-CoA desidrogenase	AAC73325	1.3.99.3, 1.3.99.-	redução na degradação de ácido graxo

Designação do Gene	Organismo - fonte	Nome da Enzima	Nº de Acesso	Número EC	Uso Exemplificativo
fadR	<i>E. coli</i>	proteína reguladora de transcrição	NP_415705	nenhum	bloqueio ou reversão na degradação de ácido graxo
2. Controle do Comprimento de Cadeia					
tesA (com ou sem sequência líder)	<i>E. coli</i>	tioesterase - sequência líder são os aminoácidos de 1 a 26	P0ADA1	3.1.2.-, 3.1.1.5	Comprimento de Cadeia C18
tesA (sem sequência líder)	<i>E. coli</i>	tioesterase	AAC73596, NP_415027	3.1.2.-, 3.1.1.5	Comprimento de Cadeia C18:1
tesA (mutante de <i>E. coli</i> tioesterase I complexada com ácido octanoico)	<i>E. coli</i>	tioesterase	L109P	3.1.2.-, 3.1.1.5	Comprimento de Cadeia <C18

Designação do Gene	Organismo - fonte	Nome da Enzima	Nº de Acesso	Número EC	Uso Exemplificativo
fatB1	<i>Umbellularia californica</i>	tioesterase	Q41635	3.1.2.14	C12:0 Comprimento de Cadeia
fatB2	<i>Cuphea hookeriana</i>	tioesterase	AAC49269	3.1.2.14	Comprimento de Cadeia C8:0 - C10:0
fatB3	<i>Cuphea hookeriana</i>	tioesterase	AAC72881	3.1.2.14	Comprimento de Cadeia C14:0 - C16:0
fatB	<i>Cinnamomum camphora</i>	tioesterase	Q39473	3.1.2.14	Comprimento de Cadeia C14:0
fatB	<i>Arabidopsis</i>	tioesterase	CAA85388	3.1.2.14	Comprimento de Cadeia C16:1
	<i>thaliana</i>				
fatA1	<i>Helianthus annuus</i>	tioesterase	AAL79361	3.1.2.14	Comprimento de Cadeia C18:1
atfata	<i>Arabidopsis thaliana</i>	tioesterase	NP_189147 , NP_193041	3.1.2.14	Comprimento de Cadeia C18:1
fatA	<i>Brassica juncea</i>	tioesterase	CAC39106	3.1.2.14	Comprimento de Cadeia C18:1
fatA	<i>Cuphea hookeriana</i>	tioesterase	AAC72883	3.1.2.14	Comprimento de Cadeia C18:1

Designação do Gene	Organismo - fonte	Nome da Enzima	Nº de Acesso	Número EC	Uso Exemplificativo
	<i>a</i>				
tes	<i>Photobacterium profundum</i>	tioesterase	YP_130990	3.1.2.14	Comprimento de Cadeia
tesB	<i>E. coli</i>	tioesterase	NP_414986	3.1.2.14	Comprimento de Cadeia
fadM	<i>E. coli</i>	tioesterase	NP_414977	3.1.2.14	Comprimento de Cadeia
yciA	<i>E. coli</i>	tioesterase	NP_415769	3.1.2.14	Comprimento de Cadeia
ybgC	<i>E. coli</i>	tioesterase	NP_415264	3.1.2.14	Comprimento de Cadeia
3. Controle do Nível de Saturação*					
Sfa	<i>E. coli</i>	Suppressor de fabA	AAN79592, AAC44390	nenhum	aumento de ácidos graxos monoinsaturados
fabA	<i>E. coli K12</i>	β -hidroxidecanoil tioéster desidratase/isomerase	NP_415474	4.2.1.60	produção de ácidos graxos insaturados
GnsA	<i>E. coli</i>	supressores da mutação nula de secG	ABD18647.1	nenhum	aumento de ésteres de ácidos graxos insaturados
GnsB	<i>E. coli</i>	supressores da mutação nula de secG	AAC74076.1	nenhum	aumento de ésteres de ácidos graxos insaturados

Designação do Gene	Organismo - fonte	Nome da Enzima	Nº de Acesso	Número EC	Uso Exemplificativo
fabB	<i>E. coli</i>	3-oxoacil-[proteína carreadora de acila] sintase I	BAA16180	2.3.1.41	produção de ácido graxo modulado insaturado
des	<i>Bacillus subtilis</i>	D5 acila graxa dessaturase	034653	1.14.19	produção de ácido graxo modulado insaturado
4. Emissão de Produto: Produção de Cera					
AT3G51970	<i>Arabidopsis thaliana</i>	álcool graxo de cadeia longa 0-aciltransferase	NP_190765	2.3.1.26	produção de cera
EL01	<i>Pichia angusta</i>	ácido graxo elongase	BAD98251	2.3.1.-	produção de ácidos graxos de cadeias muito longas
plsC	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	aciltransferase	AAA16514	2.3.1.51	produção de cera
DAGAT/DGAT	<i>Arabidopsis thaliana</i>	diacilglicerol aciltransferase	AAF19262	2.3.1.20	produção de cera
hWS	<i>Homo sapiens</i>	acil-CoA cera álcool aciltransferase	AAX48018	2.3.1.20	produção de cera
aft1	<i>Acinetobacter</i>	éster de cera bifuncional	AA017391	2.3.1.20	produção de cera

Designação do Gene	Organismo - fonte	Nome da Enzima	Nº de Acesso	Número EC	Uso Exemplificativo
	<i>sp. ADP1</i>	sintase/acil-CoA:diacilglicerol aciltransferase			
ES9	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	éster de cera sintase	AB021021	2.3.1.20	produção de cera
<i>mWS</i>	<i>Simmondsia chinensis</i>	éster de cera sintase	AAD38041	2.3.1.-	produção de cera
5. Emissão de Produto: Emissão de Álcool Graxo					
		tioesterases (consulte acima)			aumento de produção de álcool graxo e ácido graxo
BmFAR	<i>Bombyxmori</i>	FAR (acil-CoA redutase formadora de álcool graxo)	BAC79425	1.1.1.-	conversão de acil-CoA em álcool graxo
acr1	<i>Acinetobacter sp. ADP1</i>	acil-CoA redutase	YP_047869	1.2.1.42	reduzir acila graxa-CoA to aldeídos graxos
yqhD	<i>E. coli W3110</i>	álcool desidrogenase	AP_003562	1.1.-.-	redução de aldeídos graxos a álcoois graxos;

Designação do Gene	Organismo - fonte	Nome da Enzima	Nº de Acesso	Número EC	Uso Exemplificativo
					aumento da produção de álcool graxo
alrA	<i>Acinetobacter sp. ADP1</i>	álcool desidrogenase	CAG70252	1.1.-.-	redução de aldeídos graxos a álcoois graxos
BmFAR	<i>Bombyx mori</i>	FAR (acil-CoA redutase formadora de álcool graxo)	BAC79425	1.1.1.-	redução de acila graxa-CoA a álcool graxo
GTNG_1865	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> NG80-2	aldeído de cadeia longa desidrogenase	YP_001125970	1.2.1.3	redução de aldeídos graxos a álcoois graxos
AAR	<i>Synechococcus elongates</i>	Acil-ACP redutase	YP_400611	1.2.1.42	redução de acila graxa-ACP/CoA a aldeídos graxos
carB	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	proteína redutase de ácido carboxílico	YP_889972	6.2.1.3, 1.2.1.42	redução de ácidos graxos a aldeído graxo
FadD	<i>E. coli K12</i>	acil-CoA sintetase	NP_416319	6.2.1.3	ativa ácidos graxos em acila graxa-CoAs
atoB	<i>Erwinia</i>	acetil-CoA	YP_049388	2.3.1.9	produção de butanol

Designação do Gene	Organismo - fonte	Nome da Enzima	Nº de Acesso	Número EC	Uso Exemplificativo
	<i>roto vora</i>	acetiltransferase			
hbd	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	Beta-hidroxibutiril-CoA desidrogenase	BAD51424	1.1.1.157	produção de butanol
CPE0095	<i>Clostridium perfringens</i>	crotonasebutiril-CoA desidrogenase	BAB79801	4.2.1.55	produção de butanol
bcd	<i>Clostridium beijerinckii</i>	butiril-CoA desidrogenase	AAM14583	1.3.99.2	produção de butanol
ALDH	<i>Clostridium beijerinckii</i>	aldeído acilador da coenzima A desidrogenase	AAT66436	1.2.1.3	produção de butanol
AdhE	<i>E. coli CFT073</i>	aldeído-álcool desidrogenase	AAN80172	1.1.1.1 1.2.1.10	produção de butanol
6. Emissão de Acetil Éster de Álcool Graxo					
		tioesterases (consulte acima)			modificar emissão
acr1	<i>Acinetobacter sp. ADP1</i>	acil-CoA redutase	YP_047869	1.2.1.42	modificar emissão

Designação do Gene	Organismo - fonte	Nome da Enzima	Nº de Acesso	Número EC	Uso Exemplificativo
yqhD	<i>E. Coli K12</i>	álcool desidrogenase	AP_003562	1.1.-.-	modificar emissão
AAT	<i>Fragaria x ananassa</i>	álcool O-acetiltransferase	AAG13130	2.3.1.84	modificar emissão

7. Exportação de Produto

AtMRP5	<i>Arabidopsis thaliana</i>	resistência a multidroga associada a <i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_171908	nenhum	modificar quantidade de exportação de produto
AmiS2	<i>Rhodococcus sp.</i>	AmiS2 transportador de ABC	JC5491	nenhum	modificar quantidade de exportação de produto
AtPGP1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> p glicoproteína 1	NP_181228	nenhum	modificar quantidade de exportação de produto
AcrA	<i>Candidatus Prorotococcus diazotrophicus</i>	proteína de transporte acrA de efluxo de multidroga putativa	CAF23274	nenhum	modificar quantidade de exportação de produto
AcrB	<i>Candidatus Prorotococcus diazotrophicus</i>	provável	CAF23275	nenhum	modificar

Designação do Gene	Organismo - fonte	Nome da Enzima	Nº de Acesso	Número EC	Uso Exemplificativo
	<i>sPr otochlamy diaa moebophila a UWE25</i>	proteína de transporte acrB de efluxo de multidroga			quantidade de exportação de produto
TolC	<i>Francisella latul arensis subsp. novicida</i>	Proteína de membrana externa [biogênese de envelope celular,	ABD59001	nenhum	modificar quantidade de exportação de produto
AcrE	<i>Shigella sonnei Ss046</i>	proteína de transmembrana afeta a formação do septum e a permeabilidade da membrana celular	YP_312213	nenhum	modificar quantidade de exportação de produto
AcrF	<i>E. coli</i>	proteína F de resistência a acriflavina	P24181	nenhum	modificar quantidade de exportação de produto
tll1619	<i>Theriosynechococcus</i>	transportador de efluxo de multidroga	NP_682409 .1	nenhum	modificar quantidade de exportação de

Designação do Gene	Organismo - fonte	Nome da Enzima	Nº de Acesso	Número EC	Uso Exemplificativo
	<i>elongatus</i> [BP-1]				produto
tll0139	<i>Therinosynechococcus elongatus</i> [BP-1]	transportador de efluxo de multidroga	NP_680930.1	nenhum	modificar quantidade de exportação de produto
8. Fermentação					
genes de ponto de checagem de replicação					aumento da eficiência de emissão
umuD	<i>Shigella sonnei</i> Ss046	DNA polimerase V, subunidade	YP_310132	3.4.21.-	aumento da eficiência de emissão
umuC	<i>E. coli</i>	DNA polimerase V, subunidade	ABC42261	2.7.7.7	aumento da eficiência de emissão
pntA, pntB	<i>Shigella flexneri</i>	NADH:NADPH transidrogenase (subunidades alfa e beta)	P07001, POAB70	1.6.1.2	aumento da eficiência de emissão
9. Outros					
fabK	<i>Streptococcus</i>	<i>trans</i> -2-enoil-ACP redutase II	AAF98273	1.3.1.9	contribui para a biossíntese de

Designação do Gene	Organismo - fonte	Nome da Enzima	Nº de Acesso	Número EC	Uso Exemplificativo
	<i>pneunioni</i> <i>ae</i>				ácido graxo
fabL	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>DSM 13</i>	enoil-(proteína carreadora de acila) redutase	AAU39821	1.3.1.9	contribui para a biossíntese de ácido graxo
fabM	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>trans</i> -2, <i>cis</i> -3-decenoil-ACP isomerase	DAA05501	4.2.1.17	contribui para a biossíntese de ácido graxo

Produção de Ácidos Graxos

[0094] As células hospedeiras recombinantes podem incluir uma ou mais sequências de polinucleotídeos que compreendem um quadro de leitura aberto que codifica uma tioesterase, por exemplo, que têm um número de Comissão de Enzima EC 3.1.1.5 ou EC 3.1.2.- (por exemplo, EC 3.1.2.14), junto com sequências reguladoras unidas de forma operacional que facilitam a expressão da proteína nas células hospedeiras recombinantes. Nas células hospedeiras recombinantes, o quadro de leitura aberto que codifica as sequências e/ou as sequências reguladoras é modificado em relação ao gene de tipo selvagem correspondente que codifica a tioesterase. A atividade da tioesterase na célula hospedeira recombinante é modificada em relação à atividade da tioesterase expressa a partir do gene de tipo selvagem correspondente em uma célula hospedeira correspondente. Em algumas modalidades, uma composição de derivado de ácido graxo que inclui ácidos graxos é

produzida por desenvolvimento em cultura de uma célula recombinante na presença de uma fonte de carbono sob condições eficazes para expressar a tioesterase. Em modalidades relacionadas, a célula hospedeira recombinante compreende um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que tem atividade de tioesterase e um ou mais polinucleotídeos adicionais que codificam polipeptídeos que têm outras atividades de enzima biossintética de ácido graxo. Em algumas tais casos, o ácido graxo produzido pela ação da tioesterase é convertido por uma ou mais enzimas que têm uma atividade de enzima biossintética de ácido graxo diferente a outro derivado de ácido graxo, tal como, por exemplo, um éster graxo, aldeído graxo, álcool graxo ou um hidrocarboneto.

[0095] O comprimento de cadeia de um ácido graxo, ou um derivado de ácido graxo feito a partir do mesmo, pode ser selecionado modificando-se a expressão de tioesterases particulares. A tioesterase irá influenciar o comprimento de cadeia de derivados dos ácidos graxos produzidos. O comprimento de cadeia de um substrato de derivado de ácido graxo pode ser selecionado modificando-se a expressão de tioesterases selecionadas (EC 3.1. 2.14 ou EC 3.1.1.5). Por isso, células hospedeiras podem ser projetada por engenharia para expressar, superexpressar, ter expressão atenuada ou não expressar uma ou mais tioesterases selecionadas para aumentar a produção de um substrato de derivado de ácido graxo preferencial. Por exemplo, ácidos graxos C10 podem ser produzidos expressando-se uma tioesterase que tem uma preferência por produzir ácidos graxos C10 e tioesterases atenuantes que têm uma

preferência por produzir ácidos graxos outros que não os ácidos graxos C10 (por exemplo, uma tioesterase que prefere produzir ácidos graxos C14). Isso resultaria em uma população relativamente homogênea de ácidos graxos que têm um comprimento de cadeia de carbono de 10. Em outros casos, ácidos graxos C14 podem ser produzidos atenuando-se tioesterases endógenas que produzem ácidos graxos não C14 e expressando-se as tioesterases que usam C14-ACP. Em algumas situações, ácidos graxos C12 podem ser produzidos expressando-se tioesterases que usam C12-ACP e tioesterases atenuantes que produzem ácidos graxos não C12. Por exemplo, ácidos graxos C12 podem ser produzidos expressando-se uma tioesterase que tem uma preferência por produzir ácidos graxos C12 e tioesterases atenuantes que têm uma preferência por produzir ácidos graxos outros que não os ácidos graxos C12). Isso resultaria em uma população relativamente homogênea de ácidos graxos que têm um comprimento de cadeia de carbono de 12. Os derivados de ácido graxo são recuperados a partir de meio de cultura substancialmente com todos os derivados de ácido graxo produzidos de maneira extracelular. A composição de derivado de ácido graxo produzida por uma célula hospedeira recombinante pode ser analisada com o uso de métodos conhecidos na técnica, por exemplo, GC-FID, a fim de determinar a distribuição de derivados de ácido graxo particulares, bem como determinar comprimentos de cadeia e grau de saturação dos componentes da composição de derivado de ácido graxo. A sobreprodução de acetil-CoA, malonil-CoA e ácido graxo pode ser verificada com o uso de métodos conhecidos na técnica, por exemplo, pelo uso de precursores

radioativos, HPLC, ou GC-MS subsequentes à lise celular. Exemplos adicionais não limitantes de tioesterases e polinucleotídeos que as codificam para uso na trajetória de ácido graxo são fornecidos no Pedido de Publicação PCT nº W02010/075483, incorporado expressamente a título de referência ao presente documento.

Produção de Aldeídos Graxos

[0096] Em uma modalidade, a célula hospedeira recombinante produz um aldeído graxo. Em algumas modalidades, um ácido graxo produzido pela célula hospedeira recombinante é convertido em um aldeído graxo. Em algumas modalidades, o aldeído graxo produzido pela célula hospedeira recombinante é então convertido em um álcool graxo ou um hidrocarboneto. Em algumas modalidades, polipeptídeos biossintetizantes de aldeído graxo nativos (endógenos), tais como aldeído redutases, estão presentes na célula hospedeira (por exemplo, *E. coli*) e são eficazes na conversão de aldeídos graxos em álcoois graxos. Em outras modalidades, um polipeptídeo biossintetizante de aldeído graxo nativo (endógeno) é superexpresso. Em ainda outras modalidades, um polipeptídeo biossintetizante de aldeído graxo exógeno é introduzido em uma célula hospedeira recombinante e expresso ou superexpresso. Uma célula hospedeira ou nativa recombinante pode compreender um polinucleotídeo que codifica uma enzima que tem atividade biossintetizante de aldeído graxo (por exemplo, um polipeptídeo biossintetizante de aldeído graxo ou um polipeptídeo biossintetizante de aldeído graxo ou enzima). Um aldeído graxo é produzido quando a enzima biossintetizante de aldeído graxo é expressa ou

superexpressa na célula hospedeira. Uma célula hospedeira recombinante projetada por engenharia para produzir um aldeído graxo tipicamente converterá parte do aldeído graxo em um álcool graxo. Em algumas modalidades, um aldeído graxo é produzido expressando-se ou superexpressando-se na célula hospedeira recombinante um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que tem atividade biossintetizante de aldeído graxo tal como atividade de ácido carboxílico redutase (CAR). CarB é um ácido carboxílico redutase exemplificativa. Ao praticar a revelação, um gene que codifica um polipeptídeo de ácido carboxílico redutase pode ser expresso ou superexpresso na célula hospedeira. Em algumas modalidades, o polipeptídeo CarB tem a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 7. Em outras modalidades, o polipeptídeo CarB é uma variante ou mutante de SEQ ID NO: 7. Exemplos de ácido carboxílico redutase (CAR), os polipeptídeos e polinucleotídeos que as codificam incluem, mas não se limitam a FadD9 (EC 6.2.1.-, UniProtKB Q50631, GenBank NP_217106, SEQ ID NO: 34), CarA (GenBank ABK75684), CarB (GenBank YP889972; SEQ ID NO: 33) e polipeptídeos relacionados descritos na Publicação PCT nº W02010/042664 e na Patente nº US 8.097.439, sendo que ambos documentos estão expressamente incorporados a título de referência no presente documento. Em algumas modalidades a célula hospedeira recombinante compreende adicionalmente um polinucleotídeo que codifica uma tioesterase. Em algumas modalidades, o aldeído graxo é produzido expressando-se ou superexpressando-se na célula hospedeira recombinante um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo biossintetizante de aldeído graxo, tal como um polipeptídeo

que tem atividade de acil-ACP redutase (AAR). A expressão de acil-ACP redutase em uma célula hospedeira recombinante resulta na produção de aldeídos graxos e álcoois graxos (consulte Figura 4). As aldeído redutases nativas (endógenas) presentes em uma célula hospedeira recombinante (por exemplo, *E. coli*) podem converter aldeídos graxos em álcoois graxos. Os polipeptídeos de acil-ACP redutase exemplificativos são descritos nas Publicações PCT nos W02009/140695 e W0/2009/140696, sendo que ambas estão expressamente incorporadas a título de referência ao presente documento. Uma composição que compreende aldeídos graxos (uma composição de aldeído graxo) é produzida desenvolvendo-se em cultura uma célula hospedeira na presença de uma fonte de carbono sob condições eficazes para expressar a enzima biossintetizante de aldeído graxo. Em algumas modalidades, a composição de aldeído graxo compreende aldeídos graxos e álcoois graxos. Tipicamente, a composição de aldeído graxo é recuperada a partir do ambiente extracelular da célula hospedeira recombinante, isto é, do meio de cultura celular.

Produção de Álcoois Graxos

[0097] Em algumas modalidades, a célula hospedeira recombinante inclui um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo (uma enzima) que tem atividade biossintetizante de álcool graxo (um polipeptídeo biossintetizante de álcool graxo ou uma enzima biossintetizante de álcool graxo) e um álcool graxo é produzido pela célula hospedeira recombinante. Uma composição que compreende álcoois graxos (uma composição de álcool graxo) pode ser produzida desenvolvendo-se em

cultura a célula hospedeira recombinante na presença de uma fonte de carbono sob condições eficazes para expressar uma enzima biossintetizante de álcool graxo. Em algumas modalidades, a composição de álcool graxo compreende álcoois graxos, entretanto, uma composição de álcool graxo pode compreender outros derivados de ácido graxo. Tipicamente, a composição de álcool graxo é recuperada a partir do ambiente extracelular da célula hospedeira recombinante, isto é, do meio de cultura celular. Em uma abordagem, as células hospedeiras recombinantes foram projetadas por engenharia para produzir álcoois graxos expressando-se uma tioesterase, que catalisa a conversão de acil-ACPs em ácidos graxos livres (FFAs) e um ácido carboxílico redutase (CAR), que converte ácidos graxos livres em aldeídos graxos. Os aldeídos redutases nativas (endógenas) presentes na célula hospedeira (por exemplo, *E. coli*) podem converter aldeídos graxos em álcoois graxos. Em algumas modalidades, polipeptídeos biossintetizantes de aldeído graxo nativos (endógenos), tais como aldeído redutases, estão presentes na célula hospedeira e podem ser suficientes na conversão de aldeídos graxos em álcoois graxos. Entretanto, em outras modalidades, um polipeptídeo biossintetizante de aldeído graxo nativo (endógeno) é superexpresso e, em ainda outras modalidades, um polipeptídeo biossintetizante de aldeído graxo exógeno é introduzido em uma célula hospedeira recombinante e expresso ou superexpresso. Em algumas modalidades, o álcool graxo é produzido expressando-se ou superexpressando-se na célula hospedeira recombinante um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que tem atividade biossintetizante

de álcool graxo que converte um aldeído graxo em um álcool graxo. Por exemplo, um álcool desidrogenase (aldeído redutase, por exemplo, EC 1.1.1.1), pode ser usada ao praticar a revelação. Conforme usado no presente documento, um álcool desidrogenase se refere a um polipeptídeo com capacidade para catalisar a conversão de um aldeído graxo em um álcool (por exemplo, um álcool graxo). Uma pessoa de habilidade comum na técnica perceberá que certas desidrogenase de álcool têm a capacidade de catalisar outras reações também e que essas álcool desidrogenase não específicas também são englobadas pela álcool desidrogenase. Exemplos de álcool desidrogenase, os polipeptídeos úteis de acordo com a revelação incluem, mas não se limitam a, AlrA de *Acinetobacter sp.* M-1 (SEQ ID NO: 3) ou homólogos de AlrA, tais como AlrAadpl (SEQ ID NO: 4) e álcool desidrogenases endógenas à *E. coli*, tais como YjgB, (AAC77226) (SEQ ID NO: 5), DkgA (NP_417485), DkgB (NP_414743), YdjL (AAC74846), YdjJ (NP_416288), AdhP (NP_415995), YhdH (NP_417719), YahK (NP_414859), YphC (AAC75598), YqhD (446856) e YbbO [AAC73595.1]. Exemplos adicionais são descritos nos Pedidos de Publicação de Patente Internacionais nº WO 2007/136762, WO2008/119082 e WO 2010/062480, sendo que cada um está expressamente incorporado a título de referência no presente documento. Em certas modalidades, o polipeptídeo biossintetizante de álcool graxo tem atividade de aldeído redutase ou de álcool desidrogenase (EC 1.1.1.1).

[0098] Em outra abordagem, células hospedeiras recombinantes foram projetadas por engenharia para produzir álcoois graxos expressando-se acil-CoA redutases ou acila

graxa redutases (FARs) formadoras de álcool graxo, que convertem substratos de aciltioéster graxo (por exemplo, acil-CoA graxo ou acil-ACP graxo) em álcoois graxos. Em algumas modalidades, o álcool graxo é produzido expressando-se ou superexpressando-se um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que tem atividade de acil-CoA redutase formadora de álcool graxo (FAR) em uma célula hospedeira recombinante. Exemplos de polipeptídeos FAR úteis de acordo com essa modalidade são descritos na Publicação PCT nº W02010/062480 que está expressamente incorporada a título de referência no presente documento O álcool graxo pode ser produzido através de uma trajetória dependente de acil-CoA que utiliza intermediários de acil-ACP graxo e de acil-CoA graxo e uma trajetória independente de acil-CoA que utiliza intermediários de acil-ACP graxo, mas não um intermediário de acil-CoA graxo. Em modalidades particulares, a enzima codificada pelo gene superexpresso é selecionada dentre uma ácido graxo sintase, uma acil-ACP tioesterase, uma acil-CoA graxo sintase e uma acetil-CoA carboxilase. Em algumas modalidades, a proteína codificada pelo gene superexpresso é endógena à célula hospedeira. Em outras modalidades, a proteína codificada pelo gene superexpresso é heteróloga à célula hospedeira. Os álcoois graxos também são feitos na natureza por enzimas com capacidade de reduzir várias moléculas de acil-ACP ou acil-CoA em álcoois primários correspondentes. Consulte também as Publicações de Patente nº US 20100105963 e US 20110206630 e a Patente nº US 8097439, expressamente incorporadas a título de referência ao presente documento. As estratégias para aumentar a produção de álcoois graxos

por células hospedeiras recombinantes incluem o fluxo aumentado através de trajetória biossintética do ácido graxo por superexpressão de genes biossintéticos nativos de ácido graxo e/ou por expressão de genes biossintetizantes de ácido graxo exógenos de diferentes organismos no hospedeiro produtor, de forma que a biossíntese de álcool graxo seja aumentada.

Produção de Ésteres

[0099] Conforme usado no presente documento, o termo "éster graxo" pode ser usado como uma referência a um éster. Um éster graxo, conforme referido no presente documento, pode ser qualquer éster feito a partir de um ácido graxo, por exemplo, um éster de ácido graxo. Em algumas modalidades, um éster graxo contém um lado A e um lado B. Conforme usado no presente documento, um "lado A" de um éster se refere à cadeia de carbono anexada ao oxigênio carboxilado do éster. Conforme usado no presente documento, um "lado B" de um éster se refere à cadeia de carbono que compreende o carboxilado mãe do éster. Em modalidades em que o éster graxo é derivado da trajetória biossintética do ácido graxo, o lado A recebe contribuição de um álcool e o lado B recebe contribuição de um ácido graxo. Qualquer álcool pode ser usado para formar o lado A dos ésteres graxos. Por exemplo, o álcool pode ser derivado da trajetória biossintética do ácido graxo. Alternativamente, o álcool pode ser produzido através de trajetórias biossintéticas que não são de ácido graxo. Além disso, o álcool pode ser fornecido de forma exógena. Por exemplo, o álcool pode ser provido no caldo de fermentação em casos nos quais o éster graxo é produzido por um

organismo. Alternativamente, um ácido carboxílico, tal como um ácido graxo ou um ácido acético, pode ser provido de forma exógena em casos nos quais o éster graxo é produzido por um organismo que pode também produzir álcool. A cadeia de carbonos que compreende o lado A ou lado B pode ser de qualquer comprimento. Em uma modalidade, o lado A do éster é de pelo menos cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 16 ou 18 carbonos de comprimento. Quando o éster graxo é um éster metílico de ácido graxo, o lado A do éster é de 1 carbono de comprimento. Quando o éster graxo é um éster de ácido graxo etílico, o lado A do éster é de 2 carbonos de comprimento. O lado B do éster pode ser de pelo menos cerca de 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 ou 26 carbonos de comprimento. O lado A e/ou o lado B podem ser de cadeia linear ou ramificada. As cadeias ramificadas podem ter um ou mais pontos de ramificação. Adicionalmente, as cadeias ramificadas podem incluir ramificações cíclicas. Ademais, o lado A e/ou lado B podem ser saturados ou insaturados. Caso insaturado, o lado A e/ou o lado B podem ter um ou mais pontos de insaturação. Em uma modalidade, o éster graxo é produzido de maneira biossintética. Nessa modalidade, primeiro o ácido graxo é ativado. Exemplos não limitantes de ácidos graxos "ativados" são acil-CoA, acil ACP e acilfosfato. O Acil-CoA pode ser um produto direto da biossíntese ou degradação do ácido graxo. Adicionalmente, o acil-CoA pode ser sintetizado a partir de um ácido graxo livre, de um CoA e de uma adenosina nucleotídeo trifosfato (ATP). Um exemplo de uma enzima que produz acil-CoA é a acil-CoA sintase. Em algumas modalidades, a célula hospedeira recombinante compreende um polinucleotídeo que

codifica um polipeptídeo, por exemplo, uma enzima que tem atividade de éster sintase, (um polipeptídeo éster sintase ou uma éster sintase).

[00100] Um éster graxo é produzido por uma reação catalisada pelo polipeptídeo de éster sintase expresso ou superexpresso na célula hospedeira recombinante. Em algumas modalidades, uma composição que compreende ésteres graxos é produzida desenvolvendo-se em cultura a célula recombinante na presença de uma fonte de carbono sob condições eficazes para expressar um éster sintase. Em algumas modalidades, a composição de ésteres graxos é recuperada a partir da cultura celular. Os polipeptídeos de éster sintase incluem, por exemplo, um polipeptídeo de éster sintase classificado como EC 2.3.1.75, ou qualquer outro polipeptídeo que catalise a conversão de um aciltioéster em um éster graxo incluindo, sem limitação, uma tioesterase, uma éster sintase, uma acil-CoA:álcool transacilase, uma aciltransferase, ou uma acil-CoA graxo :álcool graxo aciltransferase. Por exemplo, o polinucleotídeo pode codificar cera/dgat, uma éster sintase/acil-CoA:diacilglicerol aciltransferase bifuncional a partir de *Simmondsia chinensis*, da cepa ADP de *Acinetobacter* sp., *Alcanivorax borkumensis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Fundibacter jadensis*, *Arabidopsis thaliana* ou *Alkaligenes eutrophus*. Em uma modalidade particular, o polipeptídeo de éster sintase é uma diacilglicerol O-aciltransferase de *Acinetobacter* sp. (cera-dgaT; UniProtKB Q8GGG1, GenBank AA017391) ou *Simmondsia chinensis* cera sintase (UniProtKB Q9XGY6, GenBank AAD38041. Em outra modalidade, o polipeptídeo de éster sintase é por exemplo ES9 (uma cera

éster sintase de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* DSM 8798, UniProtKB A3RE51 (SEQ ID NO: 6); ES8 de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* DSM8789 (GenBank nº de Acesso AB021021; SEQ ID NO:7); GenBank AB021021, codificado pelo gene ws2; ou ES376 (outra cera éster sintase derivada de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* DSM 8798, UniProtKB A3RE50, GenBank AB021020, codificada pelo gene wsl. Em uma modalidade particular, o polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo de éster sintase é superexpresso na célula hospedeira recombinante. Em algumas modalidades, um éster de ácido graxo é produzido por uma célula hospedeira recombinante projetada por engenharia para expressar três enzimas biossintetizantes de ácido graxo: uma enzima tioesterase, uma enzima acil-CoA sintetase (fadD) e uma enzima éster sintase (por exemplo, o sistema de três enzimas; consulte Figura 5). Em outras modalidades, um éster de ácido graxo é produzido por uma célula hospedeira recombinante projetada por engenharia para expressar uma enzima biossintética de ácido graxo, uma enzima éster sintase (por exemplo, o sistema de uma enzima; consulte a Figura 5). Exemplos não limitantes de polipeptídeos e polinucleotídeos de éster sintase que os codificam adequados para uso nessas modalidades incluem aqueles descritos nas Publicações PCT nº W02007/136762 e W02008/119082 e W0/2011/038134 (sistema de três enzimas) e W0/2011/038132 (sistema de uma enzima), sendo que cada um está expressamente incorporado a título de referência no presente documento. A célula hospedeira recombinante pode produzir um éster graxo, tal como um éster metílico de ácido graxo, um éster de ácido graxo etílico ou um éster de

cera no ambiente extracelular da células hospedeiras.

Produção de Hidrocarbonetos

[00101] Esse aspecto da revelação é baseado pelo menos em parte na constatação de que alterar o nível de expressão de um polipeptídeo biossintetizante de aldeído graxo, por exemplo, um polipeptídeo de acil-ACP redutase (EC 6.4.1.2) e um polipeptídeo biossintetizante de hidrocarboneto, por exemplo, uma decarbonilase em uma célula hospedeira recombinante, facilita a produção acentuada de hidrocarbonetos pela célula hospedeira recombinante. Em uma modalidade, a célula hospedeira recombinante produz um hidrocarboneto, tal como um alceno ou um alceno (por exemplo, uma olefina terminal ou uma olefina interna) ou uma cetona. Em algumas modalidades, um aldeído graxo produzido por uma célula hospedeira recombinante é convertido por decarbonilação, o que remove um átomo de carbono para formar um hidrocarboneto. Em outras modalidades, um ácido graxo produzido por uma célula hospedeira recombinante é convertido por decarboxilação, o que remove um átomo de carbono para formar uma olefina terminal. Em algumas modalidades, um intermediário de acil-ACP é convertido por decarboxilação, o que remove um átomo de carbono para formar uma olefina interna ou uma cetona (consulte a Figura 6). Em algumas modalidades, a célula hospedeira recombinante compreende um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo (uma enzima) que tem atividade biossintetizante de hidrocarboneto (um polipeptídeo biossintetizante de hidrocarboneto ou uma enzima biossintetizante de hidrocarboneto) e o hidrocarboneto é produzido por expressão ou superexpressão da enzima

biossintetizante de hidrocarboneto em uma célula hospedeira recombinante. Uma trajetória biossintética de alcano de cianobactérias que consiste em uma proteína carreadora de acila-acila redutase (AAR) e uma aldeído decarbonilase (ADC), que juntas convertem intermediários de metabolismo de ácido graxo em alcanos e alcenos, tem sido usada para projetar por engenharia as células hospedeiras recombinantes para a produção de hidrocarbonetos (Figura 6). A segunda de duas reações na trajetória através da qual os acil-ACPs saturados são convertidos em alcanos em cianobactérias compreende a cisão da ligação C1-C2 de um intermediário de aldeído graxo pela enzima aldeído decarbonilase (ADC), uma proteína similar à ferritina com um cofator metálico binuclear de composição desconhecida. Em algumas modalidades, o hidrocarboneto é produzido expressando-se ou superexpressando-se na célula hospedeira recombinante um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que tem atividade biossintetizante de hidrocarboneto, tal como uma atividade de aldeído decarbonilase (ADC) (por exemplo, EC 4.1.99.5). Os polinucleotídeos exemplificativos que codificam uma aldeído decarbonilase úteis de acordo com essa modalidade incluem, mas não se limitam a, aqueles descritos em nas Publicações PCT nos W02008/119082 e W02009/140695 que estão incorporadas expressamente a título de referência no presente documento e aquelas sequências apresentadas na Tabela 2 abaixo. Em algumas modalidades a célula hospedeira recombinante compreende adicionalmente um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo biossintetizante de aldeído graxo. Em algumas modalidades a célula hospedeira

recombinante compreende adicionalmente um polinucleotídeo que codifica uma acil-ACP redutase. Consulte, por exemplo, a Tabela 2 abaixo.

Tabela 2: Polinucleotídeos e Polipeptídeos Biossintetizantes de Hidrocarboneto Exemplificativos

Nome da Proteína	Sequência polipeptídica	Sequência Nucleotídica	Sequência
Decarbonilase (ADC)	SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 36	<i>Synechococcus elongatus</i> PCC7942 YP.sub.--400610 (Synpcc7942.sub.--1593)
Acil-ACP Redutase (AAR)	SEQ ID NO: 37	SEQ ID NO: 38	<i>Synechococcus elongatus</i> PCC7942 YP 400611 (Synpcc7942 1594)
Decarbonilase (ADC)	SEQ ID NO: 39	SEQ ID NO: 40	<i>Prochlorococcus marinus</i> CCMP1986 PMM0532
Acil-ACP Redutase (AAR)	SEQ ID NO: 41	SEQ ID NO: 42	<i>Prochlorococcus marinus</i> CCMP1986 PMM0533 (NP_892651)

[00102] Em algumas modalidades, uma composição é produzida desenvolvendo-se em cultura a célula recombinante na presença de uma fonte de carbono sob condições eficazes para expressar polinucleotídeos de Acil-CoA redutase e de decarbonilase. Em algumas modalidades, a composição de hidrocarboneto compreende hidrocarbonetos saturados e insaturados. Entretanto, uma composição de hidrocarboneto pode compreender outros derivados de ácido graxo. Tipicamente, a composição de hidrocarboneto é recuperada a partir do ambiente extracelular da célula hospedeira recombinante, isto é, do meio de cultura celular. Conforme usado no presente documento, um alcano se refere a hidrocarbonetos ou compostos saturados que consistem

somente em carbono (C) e hidrogênio (H), sendo que esses átomos são unidos juntos por ligações únicas {isto é, são compostos saturados). As olefinas e os alcenos se referem a hidrocarbonetos que contêm pelo menos uma ligação dupla carbono a carbono {isto é, são compostos insaturados). As olefinas terminais, α -olefinas, alcenos terminais e 1-alcenos se referem aos mesmos compostos, com uma referência a α -olefinas ou alcenos com uma fórmula química C_xH_{2x} , o que os distingue de outras olefinas com uma fórmula molecular similar pela linearidade da cadeia de hidrocarboneto e a posição da ligação dupla na posição alfa ou primária. Em algumas modalidades, uma olefina terminal é produzida expressando-se ou superexpressando-se na célula hospedeira recombinante um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo biossintetizante de hidrocarboneto, tal como um polipeptídeo que tem atividade decarboxilase conforme descrito, por exemplo, na Publicação PCT nº W02009/085278 que está expressamente incorporada a título de referência no presente documento, Em algumas modalidades a célula hospedeira recombinante compreende adicionalmente um polinucleotídeo que codifica uma tioesterase. Em outras modalidades, uma cetona é produzida expressando-se ou superexpressando-se na célula hospedeira recombinante um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo biossintetizante de hidrocarboneto, tal como um polipeptídeo que tem atividade OleA conforme descrito, por exemplo, na Publicação PCT nº W02008/147781, que está expressamente incorporada a título de referência no presente documento Em modalidades relacionadas, uma olefina interna é produzida expressando-se ou superexpressando-se

na célula hospedeira recombinante um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo biossintetizante de hidrocarboneto, tal como um polipeptídeo que tem atividade OleCD ou OleBCD, junto com um polipeptídeo que tem atividade OleA conforme descrito, por exemplo, na Publicação PCT nº W02008/147781, expressamente incorporada a título de referência no presente documento.

Células Hospedeiras Recombinantes e Culturas de Células

[00103] As estratégias para aumentar a produção de derivados de ácido graxo por células hospedeiras recombinantes incluem o fluxo aumentado através de trajetória biossintética do ácido graxo por superexpressão de genes biossintéticos nativos de ácido graxo e por expressão de genes biossintetizantes de ácido graxo exógenos de diferentes organismos no hospedeiro produtor. Conforme usado no presente documento, uma célula hospedeira recombinante ou projetada por engenharia célula hospedeira se refere a uma célula hospedeira da qual a composição genética foi alterada em relação à célula hospedeira de tipo selvagem correspondente, por exemplo, por introdução deliberada de novos elementos genéticos e/ou modificação deliberada de elementos genéticos naturalmente presentes na célula hospedeira. A descendência de tais células hospedeiras recombinantes também contém esses elementos genéticos novos e/ou modificados. Em qualquer um dos aspectos da revelação descrita no presente documento, a célula hospedeira pode ser selecionada a partir do grupo que consiste em uma célula vegetal, célula de inseto, célula fúngica (por exemplo, de um fungo filamentoso, tal como *Candida* sp., ou uma levedura germinativa, tal como

Saccharomyces sp.), uma célula de alga e uma célula bacteriana. Em uma modalidade preferencial, as células hospedeiras recombinantes são microrganismos recombinantes. Exemplos de células hospedeiras que são microrganismos incluem, mas não se limitam a células dos gêneros *Escherichia*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Zymomonas*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Neurospora*, *Fusarium*, *Humicola*, *Rhizomucor*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Pleurotus*, *Trametes*, *Chrysosporium*, *Saccharomyces*, *Stenotrophomonas*, *Schizosaccharomyces*, *Yarrowia* ou *Streptomyces*. Em algumas modalidades, a célula hospedeira é uma célula bacteriana gram-positiva. Em outras modalidades, a célula hospedeira é uma célula bacteriana gram-negativa. Em algumas modalidades, a célula hospedeira é uma célula de *E. coli*. Em outras modalidades, a célula hospedeira é uma célula de *Bacillus lentus*, uma célula de *Bacillus brevis*, uma célula de *Bacillus stearothermophilus*, uma célula de *Bacillus licheniformis*, uma célula de *Bacillus alkalophilus*, uma célula de *Bacillus coagulans*, uma célula de *Bacillus circulans*, uma célula de *Bacillus pumilis*, uma célula de *Bacillus thuringiensis*, uma célula de *Bacillus clausii*, uma célula de *Bacillus megaterium*, uma célula de *Bacillus subtilis* ou uma célula de *Bacillus amyloliquefaciens*. Em outras modalidades, a célula hospedeira é uma célula de *Trichoderma koningii*, uma célula de *Trichoderma viride*, uma célula de *Trichoderma reesei*, uma célula de *Trichoderma longibrachiatum*, uma célula de *Aspergillus awamori*, uma célula de *Aspergillus fumigates*, uma célula de *Aspergillus foetidus*, uma célula de

Aspergillus nidulans, uma célula de *Aspergillus niger*, uma célula de *Aspergillus oryzae*, uma célula de *Humicola insolens*, uma célula de *Humicola lanuginosa*, uma célula de *Rhodococcus opacus*, uma célula de *Rhizomucor michei* ou uma célula de *Mucor michei*. Em ainda outras modalidades, a célula hospedeira é uma célula de *Streptomyces lividans* ou uma célula de *Streptomyces murinus*. Em ainda outras modalidades, a célula hospedeira é uma célula de *Actinomycetes*. Em algumas modalidades, a célula hospedeira é uma célula de *Saccharomyces cerevisiae*. Em outras modalidades, a célula hospedeira é uma célula de uma planta eucariótica, alga, cianobactéria, bactéria verde sulfurosa, bactéria verde não sulfurosa, bactéria púrpura sulfurosa, bactéria púrpura não sulfurosa, extremófilo, levedura, fungo, um organismo projetado por engenharia dos mesmos ou um organismo sintético. Em algumas modalidades, a célula hospedeira é fotodependente ou fixadora de carbono. Em algumas modalidades, a célula hospedeira tem atividade autotrófica. Em algumas modalidades, a célula hospedeira tem atividade fotoautotrófica, tal como na presença de luz. Em algumas modalidades, a célula hospedeira é heterotrófica ou mixotrófica na ausência de luz. Em certas modalidades, a célula hospedeira é uma célula de *Arabidopsis thaliana*, *Panicum virgatum*, *Miscanthus giganteus*, *Zea mays*, *Botryococcuse braunii*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Dunaliella salina*, *Synechococcus* Sp. PCC 7002, *Synechococcus* Sp. PCC 7942, *Synechocystis* Sp. PCC 6803, *Thermosynechococcus elongates* BP-1, *Chlorobium tepidum*, *Chlorojflexus auranticus*, *Chromatium vinosum*, *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodopseudomonas palustris*,

Clostridium ljungdahlii, *Clostridiuthermocellum*, *Penicillium chrysogenum*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pseudomonas fluorescens* ou *Zymomonas mobilis*.

Produção De Composições de Derivados de Ácido Graxo por Células Hospedeiras Recombinantes

[00104] Uma ampla variedade de derivados de ácido graxo pode ser produzida por células hospedeiras recombinantes que compreendem melhorias de cepa conforme descrito no presente documento incluindo, mas sem limitação a ácidos graxos, acil-CoA, aldeídos graxos, álcoois de cadeia longa e curta, hidrocarbonetos (por exemplo, alcanos, alcenos ou olefinas, tais como olefinas terminais ou internas), álcoois graxos, ésteres (por exemplo, ésteres de cera, ésteres de ácido graxo (por exemplo, ésteres metílicos ou etílicos)) e cetonas. Em algumas modalidades da presente revelação, a maior titulação de derivados de ácido graxo em uma composição particular é uma titulação maior de um tipo particular de derivado de ácido graxo (por exemplo, álcoois graxos, ésteres de ácido graxo ou hidrocarbonetos) produzidos por uma cultura de célula hospedeira recombinante em relação à titulação dos mesmos derivados de ácido graxo produzidos por uma cultura de controle de uma célula hospedeira de tipo selvagem correspondente. Em tais casos, a composição derivada de ácidos graxos pode compreender, por exemplo, uma mistura dos álcoois graxos com uma variedade de comprimentos de cadeia e características de saturação ou ramificação. Em outras modalidades da presente revelação, a maior titulação de derivados de ácido graxo em uma composição particular é

uma maior titulação de uma combinação de diferentes derivados de ácido graxo (por exemplo, aldeídos graxos e álcoois, ou ácidos graxos e ésteres) em relação à titulação do mesmo derivado de ácido graxo produzido por uma cultura de controle de uma de célula hospedeira tipo selvagem correspondente.

Projetando por Engenharia as Células Hospedeiras

[00105] Em algumas modalidades, uma sequência de polinucleotídeos (ou genes) é fornecida à célula hospedeira por meio de um vetor recombinante, o que compreende uma unidade promotora de forma operacional à sequência de polinucleotídeos. Em certas modalidades, o promotor é um promotor regulado durante o desenvolvimento, específico de organela, específico de tecido, induzível, constitutivo ou específico de célula. Em algumas modalidades, o vetor recombinante inclui pelo menos uma sequência o que inclui, mas sem limitação a (a) uma sequência de controle de expressão acoplada de forma operacional à sequência de polinucleotídeos; (b) um marcador de seleção acoplado de forma operacional à sequência de polinucleotídeos; (c) uma sequência marcadora acoplada de forma operacional à sequência de polinucleotídeos; (d) uma porção química purificadora acoplada de forma operacional à sequência de polinucleotídeos; (e) uma sequência de secreção acoplada de forma operacional à sequência de polinucleotídeos; e (f) uma sequência de alvejamento acoplada de forma operacional à sequência de polinucleotídeos. Os vetores de expressão descritos no presente documento incluem uma sequência de polinucleotídeos descrita no presente documento em uma forma adequada para a expressão da sequência de

polinucleotídeos em uma célula hospedeira. Será percebido por pessoas versadas na técnica que o projeto do vetor de expressão pode depender de tais fatores como a escolha da célula hospedeira a ser transformada, o nível de expressão de polipeptídeo desejado, etc. Os vetores de expressão descritos no presente documento podem ser introduzidos nas células hospedeiras para produzir polipeptídeos incluindo polipeptídeos de fusão, codificados pelas sequências de polinucleotídeos conforme descrito no presente documento. A expressão de genes que codificam polipeptídeos em procariotas, por exemplo, *E. coli*, é mais comumente desempenhada com vetores que contêm promotores constitutivos ou induzíveis que direcionam a expressão tanto de polipeptídeos de fusão quanto outros. Os vetores de fusão adicionam uma quantidade de aminoácidos a um polipeptídeo codificado nos mesmos, normalmente a uma terminação amino- ou carboxi- do polipeptídeo recombinante. Tais vetores de fusão tipicamente servem um ou mais dentre os três propósitos seguintes (1) aumentar a expressão do polipeptídeo recombinante; (2) aumentar a solubilidade do polipeptídeo recombinante; e (3) auxiliar na purificação do polipeptídeo recombinante agindo como um ligante em purificação de afinidade. Comumente, em vetores de expressão de fusão, um sítio de clivagem proteolítica é introduzido na junção da porção química de fusão com o polipeptídeo recombinante. Isso possibilita a separação do polipeptídeo recombinante da porção química de fusão após a purificação do polipeptídeo de fusão. Exemplos de tais enzimas e suas sequências de reconhecimento cognato incluem Fator Xa, trombina e enterocinase. Vetores de expressão de

fusão exemplificativos incluem pGEX (Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ; Smith et al., *Gene*, 67: páginas 31 a 40 (1988)), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) e pRITS (Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, N. J.), que fundem glutational S-transferase (GST), proteína de ligação de maltose E, ou proteína A, respectivamente, ao polipeptídeo recombinante alvo. Exemplos de vetores de expressão induzíveis e não de fusão de *E. coli* incluem pTrc (Amann et al, *Gene* (1988) 69: páginas 301 a 315) e pET 11d (Studier et al, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) páginas 60 a 89). A expressão gênica direcionada do vetor pTrc depende da transcrição de RNA polimerase hospedeira de um promotor de fusão híbrido trp-lac. A expressão gênica direcionada do vetor pET 11d depende da transcrição de um promotor de fusão T7 gn10-lac mediada por uma RNA polimerase viral coexpressa (T7 gn1). Essa polimerase viral é provida pelas cepas hospedeiras BL21(DE3) ou HMS174(DE3) a partir de um prófago λ residente que porta um gene T7 gn1 sob o controle transcricional do promotor lacUV 5. Sistemas de expressão adequados tanto para células procarióticas quanto para eucarióticas são bem conhecidos na técnica; consulte, por exemplo, Sambrook et al, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edição, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989). Exemplos de vetores induzível, não de fusão de expressão de *E. coli* incluem pTrc (Amann et al, *Gene*, 69: páginas 301 a 315 (1988)) e PET 11d (Studier et al, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA, páginas 60 a 89 (1990)). Em certas modalidades, uma sequência de polinucleotídeos da revelação

é unida de forma operacional a um promotor derivado do bacteriófago T5. Em uma modalidade, a célula hospedeira é uma célula de levedura. Nessa modalidade, o vetor de expressão é um vetor de expressão de levedura. Os vetores podem ser introduzidos em células procarióticas ou eucarióticas através de vários procedimentos reconhecidos na técnica para a introdução de ácido nucleico externo (por exemplo, DNA) em uma célula hospedeira. Os métodos adequados para transformar ou transfectar células hospedeiras podem ser encontrados, por exemplo, em Sambrook et al. (supra). Para a transformação estável de células bacterianas sabe-se que, dependendo do procedimento de vetor de expressão e transformação usado, somente uma pequena fração das células irá tomar e replicar o vetor de expressão. A fim de identificar e selecionar esses transformantes, um gene que codifica um marcador selecionável (por exemplo, resistência a um antibiótico) pode ser introduzido dentro das células hospedeiras junto com o gene pertinente. Marcadores selecionáveis incluem aqueles que conferem resistência a drogas como, mas não limitadas a, ampicilina, canamicina, cloranfenicol ou tetraciclina. Os ácidos nucleicos que codificam um marcador selecionável podem ser introduzidos em uma célula hospedeira no mesmo vetor o qual codifica um polipeptídeo descrito no presente documento, ou podem ser introduzidos em um vetor separado. As células transformadas de forma estável com o ácido nucleico introduzido podem ser identificadas pelo desenvolvimento na presença de uma droga de seleção apropriada.

Células Hospedeiras

[00106] Conforme usado no presente documento, uma célula hospedeira recombinante ou projetada por engenharia é uma célula usada para produzir uma composição de derivado de ácido graxo conforme descrito adicionalmente no presente documento. Diz-se que uma célula hospedeira é uma célula hospedeira projetada por engenharia ou uma célula hospedeira recombinante se a expressão de um ou mais polinucleotídeos ou polipeptídeos na célula hospedeira for alterada ou modificada se comparada à expressão em uma célula hospedeira de tipo selvagem correspondente (por exemplo, célula de controle) sob as mesmas condições. Em qualquer um dos aspectos da revelação descrita no presente documento, a célula hospedeira pode ser selecionada a partir do grupo que consiste em uma planta eucariótica, alga, cianobactéria, bactéria verde sulfurosa, bactéria verde não sulfurosa, bactéria púrpura sulfurosa, bactéria púrpura não sulfurosa, extremófilo, levedura, fungo, organismos dos mesmos projetados por engenharia ou um organismo sintético. Em algumas modalidades, a célula hospedeira é fotodependente ou fixa carbono. Em algumas modalidades, a célula hospedeira tem atividade autotrófica. Várias células hospedeiras podem ser usadas para produzir derivados de ácido graxo, conforme descrito no presente documento.

Mutantes ou Variantes

[00107] Em algumas modalidades, o polipeptídeo é um mutante ou um variante de qualquer um dentre os polipeptídeos descritos no presente documento. Os termos mutante e variante conforme usado no presente documento se referem a um polipeptídeo que tem uma sequência de

aminoácidos que difere daquela de um polipeptídeo de tipo selvagem em pelo menos um aminoácido. Por exemplo, o mutante pode compreender um ou mais dentre as seguintes substituições de aminoácidos conservativas: substituição de um aminoácido alifático, tal como alanina, valina, leucina e isoleucina, com outro aminoácido alifático; substituição de uma serina com uma treonina; substituição de uma treonina com uma serina; substituição de um resíduo ácido, tal como ácido aspártico e ácido glutâmico, com outro resíduo ácido; substituição de um resíduo portador de um grupo amida, tal como asparagina e glutamina, com outro resíduo portador de um grupo amida; troca de um resíduo básico, tal como lisina e arginina, com outro resíduo básico; e substituição de um resíduo aromático, tal como fenilalanina e tirosina, com outro resíduo aromático. Em algumas modalidades, o mutante polipeptídeo tem aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 ou mais substituições, adições, inserções ou deleções de aminoácido. Os fragmentos ou mutantes preferenciais de um polipeptídeo retêm parte ou toda a função biológica (por exemplo, atividade enzimática) do polipeptídeo tipo selvagem correspondente. Em algumas modalidades, o fragmento ou mutante retém pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou pelo menos 98% ou mais da função biológica do polipeptídeo tipo selvagem correspondente. Em outras modalidades, o fragmento ou mutante retém aproximadamente 100% da função biológica do polipeptídeo tipo selvagem correspondente. Podem ser encontradas orientações para a determinação de quais resíduos de aminoácido podem ser substituídos, inseridos ou

deletados sem afetar a atividade biológica com o uso de programas de computador bem conhecidos na técnica, por exemplo, o software LASERGENETM (DNASTAR, Inc., Madison, WI). Em ainda outras modalidades, um fragmento ou mutante exibe uma função biológica aumentada em comparação com um de polipeptídeo tipo selvagem correspondente. Por exemplo, um fragmento ou mutante pode exibir uma melhora na atividade enzimática de pelo menos 10%, pelo menos 25%, pelo menos 50%, pelo menos 75%, ou pelo menos 90% em comparação com o polipeptídeo de tipo selvagem correspondente. Em outras modalidades, o fragmento ou mutante exibe pelo menos 100% (por exemplo, pelo menos 200%, ou pelo menos 500%) de melhora na atividade enzimática em comparação com o polipeptídeo de tipo selvagem correspondente. Compreende-se que os polipeptídeos descritos no presente documento podem ter substituições de aminoácido conservativas ou não essenciais adicionais, as quais não têm efeito substancial sobre a função do polipeptídeo. Se uma substituição particular vai ser tolerada ou não (isto é, se afetará ou não de forma adversa a função biológica, tal como a atividade de ácido carboxílico redutase) pode ser determinado conforme descrito em Bowie et al. (Science, 247: páginas 1306 a 1310 (1990)). Uma substituição conservativa de aminoácido é uma na qual o resíduo de aminoácido é substituído por um resíduo de aminoácido que tem uma cadeia lateral similar. As famílias de resíduos de aminoácido que têm cadeias laterais similares foram definidas na técnica. 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).

[00108] Os variantes podem ser de ocorrência natural ou criados *in vitro*. Em particular, tais variantes podem ser criadas com o uso de procedimentos de engenharia genética, tais como mutagênese direcionada a sítio, mutagênese química aleatória, procedimentos de deleção por Exonuclease III ou procedimentos padrão de clonagem. Alternativamente, tais variantes, fragmentos, análogos, ou derivados podem ser criados com o uso de procedimentos de síntese ou modificação química. Os métodos para produzir variantes são bem conhecidos na técnica. Os mesmos incluem procedimentos nos quais as sequências de ácido nucleico obtidas a partir de isolados naturais são modificadas para gerar ácidos nucleicos que codificam polipeptídeos que têm características que acentuam seu valor em aplicações industriais ou laboratoriais. Em tais procedimentos, uma grande variedade de sequências variantes que têm uma ou mais diferenças de nucleotídeo com relação à sequência obtida do isolado natural são geradas e caracterizadas. Tipicamente, essas diferenças de nucleotídeo resultam em alterações de aminoácido com relação aos polipeptídeos codificados pelos ácidos nucleicos a partir de isolados

naturais. Por exemplo, variantes podem ser preparadas com o uso de mutagênese aleatória e mutagênese direcionada a sítio. As mutagêneses aleatória e direcionada a sítio são descritas, por exemplo, em Arnold, Curr. Opin. Biotech., 4: páginas 450 a 455 (1993). A mutagênese aleatória pode ser atingida com o uso de PCR com tendência a erro (consulte, por exemplo, Leung et al., Technique, 1 : páginas 11 a 15 (1989); e Caldwell et al., PCR Methods Applic, 2: páginas 28 a 33 (1992)). Em PCR com tendência ao erro, o PCR é efetivado sob condições em que a fidelidade da cópia da DNA polimerase é baixa, de forma que uma alta taxa de mutações de ponto seja obtida por todo o comprimento do produto de PCR. Brevemente, em tais procedimentos, os ácidos nucleicos a ser mutagenizados (por exemplo, uma sequência de polinucleotídeos que codifica uma enzima carboxílica redutase) são misturados com iniciadores de PCR, tampão de reação, $MgCl_2$, $MnCl_2$, Taq polimerase e uma concentração apropriada de dNTPs para atingir uma alta taxa de mutação de ponto por todo o decorrer do comprimento do produto PCR. Por exemplo, a reação pode ser efetivada com o uso de 20 fmoles de ácido nucleico a ser mutagenizados, 30 pmole de cada iniciador de PCR, um tampão de reação que compreende 50 mM por kg, Tris HCl 10 mM (pH 8,3), 1% de elatina, $MgCl_2$ 7 mM, $MgCl_2$ 0,5 mM, 5 unidades de Taq polimerase, dGTP 0,2 mM, dATP 0,2 mM, dCTP a 1 mM e dTTP 1 mM. O PCR pode ser efetivado por 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 45 °C por 1 min e 72 °C por 1 min. Entretanto, será percebido que esses parâmetros podem ser variados conforme apropriado. Os ácidos nucleicos mutagenizados são então clonados em um vetor apropriado e as atividades dos polipeptídeos

codificados pelos ácidos nucleicos mutagenizados são avaliadas. A mutagênese direcionada a sítio pode ser atingida com o uso de mutagênese direcionada a oligonucleotídeo para gerar mutações específicas a sítio em qualquer DNA clonado pertinente. A mutagênese de oligonucleotídeo é descrita, por exemplo, em Reidhaar-Olson et al., Science, 241 : páginas 53 a 57 (1988). Brevemente, em tais procedimentos, uma pluralidade de oligonucleotídeos de fita dupla que portam uma ou mais mutações a ser introduzidas no DNA clonado são sintetizados e inseridos no DNA clonado a ser mutagenizado (por exemplo, uma sequência de polinucleotídeos que codifica um polipeptídeo CAR). Os clones que contêm o DNA mutagenizado são recuperados e as atividades dos polipeptídeos que os mesmos codificam são determinadas. Outro método para gerar variantes é PCR de montagem. O PCR de montagem envolve a montagem de um produto de PCR a partir de uma mistura de pequenos fragmentos de DNA. Uma grande variedade de diferentes reações de PCR ocorre em paralelo no mesmo frasco, sendo que os produtos de uma reação iniciam os produtos de outra reação. O PCR de montagem é descrito, por exemplo, na Patente nº US 5.965.408. Ainda outro método de gerar variantes é a PCR de mutagênese sexual. No PCR de mutagênese sexual, a recombinação homóloga forçada ocorre entre moléculas de DNA de sequências de DNA diferentes, mas altamente relacionadas *in vitro* como um resultado de fragmentação aleatória da molécula de DNA com base na homologia de sequência. Isso é seguido pela fixação do crossover pela extensão de iniciador em uma reação PCR. A PCR de mutagênese sexual é descrita, por exemplo, em

Stemmer, Proc. Natl. Acad. Sci., EUA, 91 : páginas 10747 a 10751 (1994). As variantes podem também ser criadas por mutagênese *in vivo*. Em algumas modalidades, as mutações aleatórias em uma sequência de ácidos nucleicos são geradas propagando-se a sequência em uma cepa bacteriana, tal como uma cepa de *E. coli*, que carrega as mutações em uma ou mais das trajetórias de reparo de DNA. Tais cepas "causadoras de mutação" têm uma taxa maior de mutação aleatória do que uma cepa de tipo selvagem. Propagar uma sequência de DNA (por exemplo, uma sequência de polinucleotídeos que codifica um polipeptídeo CAR) em uma dessas cepas eventualmente irá gerar mutações aleatórias dentro do DNA. Cepas causadoras de mutação adequadas para uso para mutagênese *in vivo* são descritas, por exemplo, Na Publicação de Pedido de Patente Internacional nº W01991/016427. Os variantes podem também ser gerados com o uso de mutagênese de cassette. Na mutagênese de cassette, uma pequena região de uma molécula de DNA de fita dupla é substituída com um "cassette" de oligonucleotídeo sintético que difere da sequência nativa. O oligonucleotídeo comumente contém uma sequência nativa alterada de maneira completa e/ou parcialmente aleatória. A mutagênese por conjunto recursivo pode também ser usada para gerar variantes. A mutagênese por conjunto recursivo é um algoritmo para projetar por engenharia uma proteína (isto é, mutagênese de proteína) desenvolvida para produzir populações diversas de mutantes fenotipicamente relacionados dos quais os membros diferem na sequência de aminoácidos. Esse método usa um mecanismo de retroalimentação para controlar vezes sucessivas de mutagênese de cassette combinatória. A mutagênese por

conjunto recursivo é descrita, por exemplo, em Arkin et al, Proc. Natl. Acad. Sci., EUA, 89: páginas 7811 a 7815 (1992). Em algumas modalidades, os variantes são criados com o uso de mutagênese por conjuntos exponenciais. A mutagênese por conjuntos exponenciais é um processo para gerar bibliotecas combinatórias com uma alta porcentagem de mutantes únicos e funcionais, sendo que pequenos grupos de resíduos são alterados de forma aleatória em paralelo para identificar, em cada posição alterada, aminoácidos que levam a proteínas funcionais. A mutagênese por conjuntos exponenciais é descrita, por exemplo, em Delegrave et al., Biotech. Res, 11: páginas 1548 a 1552 (1993). Em algumas modalidades, os variantes são criados com o uso de procedimentos de embaralhamento, sendo que algumas porções de uma pluralidade de ácidos nucleicos que codificam polipeptídeos distintos são fundidas juntas para criar sequências quiméricas de ácido nucleico que codificam polipeptídeos quiméricos conforme descrito, por exemplo, nas Patentes nº US 5.965.408 e 5.939.250. A mutagênese por inserção é a mutagênese de DNA pela inserção de uma ou mais bases. Mutações por inserção podem ocorrer naturalmente, mediadas por vírus ou transpóson, ou podem ser criadas artificialmente para propósitos de pesquisa em laboratório, por exemplo, por mutagênese de transpóson. Quando um DNA exógeno é integrado no DNA de um hospedeiro, a gravidade de qualquer mutação consequente depende inteiramente da localização no genoma do hospedeiro na qual o DNA é inserido. Por exemplo, efeitos significativos podem ser evidentes se um transpóson for inserido no meio de um gene essencial, em uma região promotora ou dentro de uma região

repressora ou acentuadora. Uma mutagênese de transposón e uma triagem de alta vazão foram feitas para encontrar mutações benéficas que aumentem a titulação ou rendimento de derivados ou derivados de ácido graxo.

Fermentação por Células Hospedeiras Recombinantes em Cultura e Culturas Celulares

[00109] Conforme usado no presente documento, o termo "fermentação" se refere de forma ampla à conversão de materiais orgânicos em substâncias-alvo por células hospedeiras, por exemplo, a conversão de uma fonte de carbono por células hospedeiras recombinantes em ácidos graxos ou derivados dos mesmos propagando-se uma cultura das células hospedeiras recombinantes em um meio que compreende a fonte de carbono. Conforme usado no presente documento, o termo "condições possibilitadoras da produção" significa quaisquer condições que permitam a uma célula hospedeira produzir um produto desejado, tal como um ácido graxo ou um derivado de ácido graxo. De maneira similar, o termo "condições nas quais a sequência de polinucleotídeos de um vetor é expressa" significa quaisquer condições que permitam a uma célula hospedeira sintetizar um polipeptídeo. As condições adequadas incluem, por exemplo, condições de fermentação. As condições de fermentação podem compreender muitos parâmetros incluindo, mas sem limitação a faixas de temperatura, níveis de aeração, taxas de alimentação e composição do meio. Cada uma dessas condições, individualmente e em combinação, permitem o desenvolvimento da célula hospedeira. A fermentação pode ser aeróbica, anaeróbica ou variações dos mesmos (tal como microaeróbica). Um meio de cultura exemplificativo inclui

caldos ou géis. Geralmente, o meio inclui uma fonte de carbono que pode ser metabolizada por uma célula hospedeira diretamente. Adicionalmente, as enzimas podem ser usadas no meio para facilitar a mobilização (por exemplo, a despolimerização de amido ou de celulose em açúcares fermentáveis) e a metabolização subsequente da fonte de carbono. Para a produção em pequena escala, as células hospedeiras projetadas por engenharia podem ser desenvolvidas em bateladas de, por exemplo, aproximadamente 100 ml, 500 ml, 1 l, 2 l, 5 l, ou 10 l; fermentadas; e induzidas para expressar uma sequência de polinucleotídeos desejada, tal como uma sequência de polinucleotídeos que codifica um polipeptídeo CAR. Para produção em larga escala, as células hospedeiras projetadas por engenharia podem ser desenvolvidas em bateladas de cerca de 10 l, 100 l, 1.000 l, 10.000 l, 100.000 l e 1.000.000 l ou mais; fermentadas; e induzidas para expressar uma sequência de polinucleotídeos desejada. Alternativamente, a fermentação por batelada alimentada em larga escala pode ser desempenhada. As composições derivadas de ácidos graxos descritas no presente documento são encontradas no ambiente extracelular da cultura de célula hospedeira recombinante e podem ser prontamente isoladas do meio de cultura. Um derivado de ácido graxo pode ser secretado pela célula hospedeira recombinante, transportado para dentro do ambiente extracelular ou transferido passivamente para dentro do ambiente extracelular da cultura de célula hospedeira recombinante. O derivado de ácido graxo é isolado de uma cultura de célula hospedeira recombinante com o uso de métodos rotineiros conhecidos na técnica.

Produtos Derivados de Células Hospedeiras Recombinantes

[00110] Conforme usado no presente documento, "fração de carbono moderno" ou FM tem o mesmo significado conforme definido pelos Materiais de Referência de Padronização do Instituto Nacional de Padronização e Tecnologia (NIST) (SRMs4990B e 4990C, conhecidos como ácidos oxálicos padrão H0xI e H0xII, respectivamente. A definição fundamental se refere a 0,95 vez a razão de isótopo $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ de H0xI (em referência ao ano 1950). Isso é mais ou menos equivalente à madeira pré-revolução industrial corrigida por decaimento. Para a biosfera existente atual (material vegetal), o FM é aproximadamente 1,1. Os bioprodutos (por exemplo, os derivados de ácido graxo produzidos de acordo com a presente revelação) que compreendem compostos orgânicos produzidos biologicamente e, em particular, os derivados de ácido graxo produzidos com o uso da trajetória biossintética do ácido graxo no presente documento, não foram produzidos a partir de fontes renováveis e, sendo assim, são novas composições de matéria. Esses novos bioprodutos podem ser distinguidos de compostos orgânicos derivados de carbono petroquímico com base em assinatura isotópica de duplo carbono ou datação por ^{14}C . Adicionalmente, a fonte específica de carbono de fonte biológica (por exemplo, glicose vs. glicerol) pode ser determinada por assinatura isotópica por duplo carbono (consulte, por exemplo, a Patente nº US 7.169.588, que está incorporada no presente documento a título de referência). A capacidade de distinguir bioprodutos de compostos orgânicos com base em petróleo é benéfica no rastreamento desses materiais no comércio. Por exemplo, compostos

orgânicos ou substâncias químicas que compreende perfis de isótopo de carbono tanto com base em petróleo quanto com base biológica podem ser distinguidos de compostos orgânicos e substâncias químicas feitas somente de material com base em petróleo. Por isso, os bioprodutos no presente documento podem ser seguidos ou rastreados no comércio com base em seu perfil de isótopo de carbono único. Os bioprodutos podem ser distinguidos de compostos orgânicos com base em petróleo comparando-se a taxa de isótopo de carbono estável ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) em cada amostra. A taxa $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ em um dado bioproduto é uma consequência da taxa $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ no dióxido de carbono atmosférico no momento em que o dióxido de carbono é fixado. A mesma também reflete a trajetória metabólica. Variações regionais também ocorrem. Dentre o petróleo, plantas C3 (as latifoliadas), plantas C4 (as gramíneas) e carbonatos marinhos, todos mostram diferenças significativas nos valores $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e no valor correspondente $\delta^{13}\text{C}$. Ademais, a matéria lipídica de plantas C3 e C4 são analisadas de forma diferente aos materiais derivados dos componentes carboidratos das mesmas plantas, como uma consequência da trajetória metabólica. Dentro da precisão de medição, as ^{13}C mostram grandes variações devido a efeitos de fracionamento de isótopo, dos quais o mais significativo para bioprodutos é o mecanismo fotossintético. A principal causa de diferenças na taxa de isótopo de carbono em plantas é fortemente associada a diferenças na trajetória da metabolização fotossintética de carbono nas plantas, particularmente a reação que ocorre durante a carboxilação primária (isto é, a fixação inicial de CO_2 atmosférico). Duas grandes classes de vegetação são

aquelas que incorporam o ciclo fotossintético "C3" (ou Calvin-Benson) e aquelas que incorporam o ciclo fotossintético "C4" (ou Hatch-Slack). Em plantas C3, a reação de fixação ou carboxilação de CO₂ primário envolve a enzima ribulose-1,5-difosfato carboxilase e o primeiro produto estável é um composto 3-carbono. As plantas C3, tais como madeiras de lei e coníferas, são dominantes em zonas de clima temperado. Em plantas C4, uma reação de carboxilação adicional que envolve outra enzima, fosfoenol-piruvato carboxilase, é a reação de carboxilação primária. O primeiro composto de carbono estável é um ácido de 4 carbonos que é subsequentemente decarboxilado. O CO₂ assim liberado é refixado pelo ciclo C3. Os exemplos de plantas C4 são gramíneas tropicais, milho e cana de açúcar. Tanto plantas C4 quanto C3 exibem uma faixa de taxas isotópicas ¹³C/¹²C, mas valores típicos são de aproximadamente -7 a cerca de -13 por mil para plantas C4 e aproximadamente -19 a cerca de -27 por mil para plantas C3 (consulte, por exemplo, Stuiver et al, Radiocarbon 19:355 (1977)). O carbono e o carvão geralmente caem nessa última faixa. A escala de medição de ¹³C foi originalmente definida por um conjunto zero por calcário Pee Dee Belemnite (PDB), em que os valores são dados em desvios desse material em partes por milhar. Os valores "δ¹³C" são expressos em partes por milhar (por mil), abreviados como, ‰, e são calculados conforme segue:

$$\delta^{13}\text{C} (\text{‰}) = [(\text{}^{13}\text{C}/\text{}^{12}\text{C}) \text{ amostra} - (\text{}^{13}\text{C}/\text{}^{12}\text{C}) \text{ padrão}] / (\text{}^{13}\text{C}/\text{}^{12}\text{C}) \text{ padrão} \times 1000$$

[00111] Dado que o material de referência PDB (RM) foi exaurido, uma série de RMs alternativos foram

desenvolvidos em cooperação com IAEA, USGS, NIST e outros laboratórios de isótopos internacionais selecionados. Notações para os desvios por mil do PDB é $\delta^{13}\text{C}$. As medidas são feitas em CO_2 por espectrometria de massa de razão estável de alta precisão (IRMS) em íons molecular íons de massas 44, 45 e 46. As composições descritas no presente documento incluem bioprodutos produzidos por qualquer um dentre os métodos descritos no presente documento incluindo, por exemplo, produtos de aldeído e álcool graxo. Especificamente, o bioproduto pode ter um $\delta^{13}\text{C}$ de cerca de -28 ou maior, aproximadamente -27 ou maior, -20 ou maior, -18 ou maior, -15 ou maior, -13 ou maior, -10 ou maior ou -8 ou maior. Por exemplo, o bioproduto pode ter um $\delta^{13}\text{C}$ de cerca de -30 a cerca de -15, de aproximadamente -27 a cerca de -19, de aproximadamente -25 a cerca de -21, de aproximadamente -15 a cerca de -5, de aproximadamente -13 a cerca de -7 ou de aproximadamente -13 a cerca de -10. Em outros casos, o bioproduto pode ter um $\delta^{13}\text{C}$ de cerca de -10, -11, -12 ou -12,3. Os bioprodutos produzidos de acordo com a revelação no presente documento podem também ser distinguidos dos compostos orgânicos com base em petróleo comparando-se a quantidade de ^{14}C em cada composto. Devido ao fato de que o ^{14}C tem uma meia vida nuclear de 5730 anos, os combustíveis baseados em petróleo que contêm carbono "mais velho" podem ser distinguidos dos bioprodutos que contêm carbono "mais novo" (consulte, por exemplo, Currie, "Source Apportionment of Atmospheric Particles", Characterization of Environmental Particles, J. Buffle e H. P. van Leeuwen, Eds., 1 de Vol. I da Série IUPAC Environmental Analytical Chemistry (Lewis Publishers, Inc.)

páginas 3 a 74, (1992)). A presunção básica da datação radiocarbônica é que a constância da concentração de ^{14}C na atmosfera leva à constância de ^{14}C em organismos vivos. Entretanto, devido aos testes nucleares atmosféricos desde 1950 e à queima de combustível fóssil desde 1850, o ^{14}C tem adquirido uma segunda característica geoquímica temporal. A concentração de CO_2 atmosférico e, por isso, na biosfera existente, aproximadamente dobrou no pico da quantidade de testes nucleares, na metade dos anos 1960. A mesma tem desde então gradualmente retornado à taxa isotópica básica de estado estável cosmogênico (atmosférico) ($^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$) de cerca de $1,2 \times 10^{-12}$, com uma "meia vida" de relaxação de 7 a 10 anos. (Essa última meia vida não deve ser entendida de forma literal; em vez disso, uma pessoa deve usar a função detalhada nuclear atmosférica de admissão/decaimento para rastrear a variação de ^{14}C atmosférico e biosférico desde o nascimento da era nuclear). É essa característica temporal biosférica mais tardia de ^{14}C que mantém a possibilidade de datação anual de carbono biosférico recente. O ^{14}C pode ser medido espectrometria de massa com aceleradores (AMS), sendo que os resultados são dados em unidades de "fração de carbono moderno" (fM). O fM é definido pelos Materiais de Referência de Padronização (SRMs) 4990B e 4990C do Instituto Nacional de Padronização e Tecnologia (NIST). Conforme usado no presente documento, "fração de carbono moderno" ou "fM" tem o mesmo significado conforme definido pelos Materiais de Referência de Padronização do Instituto Nacional de Padronização e Tecnologia (NIST), conhecidos como padrões H0xI e H0xII de ácidos oxálicos, respectivamente. A definição fundamental

se refere a 0,95 vez a razão de isótopo $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ de H_2O (em referência ao ano 1950). Isso é mais ou menos equivalente à madeira pré-revolução industrial corrigida por decaimento. Para a biosfera existente atual (material vegetal) o $\delta^{13}\text{C}$ é aproximadamente 1,1. As composições descritas no presente documento incluem bioprodutos que podem ter um $\delta^{13}\text{C}$ de pelo menos cerca de 1. Por exemplo, o bioproduto da revelação pode ter um $\delta^{13}\text{C}$ de pelo menos cerca de 1,01, um $\delta^{13}\text{C}$ de cerca de 1 a cerca de 1,5, um $\delta^{13}\text{C}$ de cerca de 1,04 a cerca de 1,18, ou um $\delta^{13}\text{C}$ de cerca de 1,111 a cerca de 1,124.

[00112] Outra medição de ^{14}C é conhecida como a porcentagem de carbono moderno (pMC). Para um arqueólogo ou geólogo com o uso de datas de ^{14}C dates, o ano 1950 é igual a "zero anos de idade". Isso também representa 100 pMC. O carbono das bombas na atmosfera atingiu quase o dobro do nível normal em 1963 no pico da quantidade de armamentos termonucleares. Essa distribuição na atmosfera tem sofrido aproximação desde seu surgimento, mostrando valores que são maiores do que 100 pMC para as plantas e animais vivos desde o ano 1950. A mesma tem diminuído gradualmente com o passar do tempo, sendo que o valor de hoje se aproxima a 107,5 pMC. Isso significa que um material fresco de biomassa, tal como milho, teria uma assinatura de ^{14}C próxima a 107,5 pMC. Os compostos baseados em petróleo terão um valor pMC de zero. A combinação de carbono fóssil carbono dos dias atuais resultará em uma diluição do teor de pMC. Presumindo-se que 107,5 pMC representa o teor de ^{14}C dos materiais de biomassa dos dias atuais e que 0 pMC representa o teor de ^{14}C de produtos baseados em petróleo,

o valor medido de pMC para um material irá refletir as proporções dos dois tipos de componentes. Por exemplo, um material 100% derivado de grãos de soja dos dias atuais daria uma assinatura de radiocarbono próxima a 107,5 pMC. Se aquele material tiver sido diluído 50% com produtos baseados em petróleo, o mesmo daria uma assinatura de radiocarbono de aproximadamente 54 pMC. Deriva-se um teor de carbono de base biológica atribuindo-se "100%" igual a 107,5 pMC e "0%" igual a 0 pMC. Por exemplo, uma amostra com uma medição de 99 pMC dará um teor de carbono de base biológica equivalente a 93%. Esse valor é chamado de resultado médio de carbono de base biológica e presume que todos os componentes dentro do material analisado se originaram ou a partir de material biológico de dias atuais ou a partir de material baseado em petróleo. Um bioproduto que compreende um ou mais derivados de ácido graxo conforme descrito no presente documento pode ter um pMC de pelo menos cerca de 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 ou 100. Em outros casos, um derivado de ácido graxo descrito no presente documento pode ter um pMC entre aproximadamente 50 e aproximadamente 100; aproximadamente 60 e aproximadamente 100; aproximadamente 70 e aproximadamente 100; aproximadamente 80 e aproximadamente 100; aproximadamente 85 e aproximadamente 100; aproximadamente 87 e aproximadamente 98; ou aproximadamente 90 e aproximadamente 95. Em ainda outros casos, um derivado de ácido graxo descrito no presente documento pode ter um pMC de cerca de 90, 91, 92, 93, 94 ou 94,2.

Triagem de Composições Derivadas de Ácidos Graxos Produzidas por Células Hospedeiras Recombinantes

[00113] Para determinar se as condições são suficientes para permitir a expressão, uma célula hospedeira pode ser cultivada, por exemplo, por aproximadamente 4, 8, 12, 24, 36 ou 48 horas. Durante e/ou após o desenvolvimento em cultura, as amostras podem ser obtidas e analisadas para determinar se as condições permitem a expressão. Por exemplo, as células hospedeiras na amostra ou no meio no qual as células hospedeiras foram desenvolvidas podem ser testadas para a presença de um produto desejado. Ao testar para a presença de um produto, os ensaios, tais como, mas não limitados a, TLC, HPLC, GC/FID, GC/MS, LC/MS, MS, podem ser usados. As culturas de célula recombinante hospedeira são triadas no nível de placa de 96 cavidades, nos níveis de tanque de 1 litro e de 5 litros e em uma planta piloto de 1.000 l com o uso de um ensaio GC/FID para "espécies graxas totais".

Utilidade de Composições Derivadas de Ácidos Graxos

[00114] Um ácido graxo é um ácido carboxílico com uma longa cauda alifática (cadeia), que ou é saturada ou insaturada. A maioria dos ácidos graxos de ocorrência natural tem uma cadeia de um número par de átomos de carbono, de 4 a 28. Os ácidos graxos são normalmente derivados de triglicerídeos. Quando os mesmos não estão anexados a outras moléculas, eles são conhecidos como ácidos graxos "livres". Os ácidos graxos normalmente são produzidos de maneira industrial pela hidrólise de triglicerídeos com a remoção de glicerol. Palmas, grãos de soja, colza, óleo de coco e óleo de girassol são atualmente as fontes mais comuns de ácidos graxos. A maior parte dos ácidos graxos derivados de tais fontes é usada em produtos

alimentícios para humanos. O óleo de coco e óleo de semente de palma consistem principalmente em ácidos graxos de carbono 12 e 14. Esses são particularmente adequados para processamento adicional para tensoativos para agentes de lavagem e limpeza, assim como cosméticos. A palma, os grãos de soja, a colza e o óleo de girassol, assim como gorduras animais tais como o sebo, contêm principalmente ácidos graxos de cadeia longa (por exemplo, C18, saturados e insaturados) que são usados como materiais brutos para aplicações de polímero e lubrificantes. Estudos ecológicos e toxicológicos sugerem que os produtos derivados de ácido graxo baseados em recursos renováveis possuem propriedades mais favoráveis do que substâncias de base petroquímica. Os aldeídos graxos são usados para produzir muitas substâncias químicas especiais. Por exemplo, os aldeídos são usados para produzir polímeros, resinas (por exemplo, Bakelite), corantes, aromatizantes, plastificantes, perfumes, substâncias farmacêuticas e outras substâncias químicas, algumas das quais podem ser usadas como solventes, conservantes, ou desinfetantes. Adicionalmente, certos compostos naturais e sintéticos, tais como vitaminas e hormônios, são aldeídos, e muitos açúcares contêm grupos aldeído. Os aldeídos graxos podem ser convertidos em álcoois graxos através de redução química ou enzimática. Os álcoois graxos possuem muitos usos comerciais. As vendas anuais mundiais de álcoois graxos e seus derivados passam de um bilhão de dólares. Os álcoois graxos de cadeia mais curta são usados nas indústrias cosmética e alimentícia como emulsificadores, emolientes e espessantes. Devido à sua natureza anfifílica, os álcoois graxos se comportam

como tensoativos não iônicos, que são úteis em produtos de cuidados pessoais e domésticos, tais como, por exemplo, detergentes. Adicionalmente, os álcoois graxos são usados em ceras, gomas, resinas, pomadas e loções farmacêuticas, aditivos de óleo lubrificante, agentes têxteis antiestática e de acabamento, plastificantes, cosméticos, solventes industriais e solventes para gorduras. A revelação também fornece uma composição tensoativa ou uma composição detergente que compreende um álcool graxo produzido por qualquer um dentre os métodos descritos no presente documento. Uma pessoa de habilidade comum na técnica perceberá que, dependendo do propósito ao qual a composição tensoativa ou detergente se destina, diferentes álcoois graxos podem ser produzidos e usados. Por exemplo, quando os álcoois graxos descritos no presente documento são usados como uma matéria-prima para a produção de tensoativos ou detergentes, uma pessoa de habilidade comum na técnica perceberá que as características da matéria-prima de álcool graxo afetarão as características da composição tensoativa ou detergente produzida. Por isso, as características da composição tensoativa ou detergente podem ser selecionadas para produzir álcoois graxos particulares para uso como uma matéria-prima. Uma composição tensoativa e/ou detergente baseada em álcool graxo descrita no presente documento pode ser misturada com outros tensoativos e/ou detergentes em conhecidos na técnica. Em algumas modalidades, a mistura pode incluir pelo menos cerca de 10%, pelo menos cerca de 15%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de

60%, ou uma faixa limitada por quaisquer dois dentre os valores anteriores, por peso de álcool graxo. Em outros exemplos, uma composição tensoativa ou detergente pode ser feita incluindo pelo menos cerca de 5%, pelo menos cerca de 10%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 85%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 95%, ou uma faixa limitada por quaisquer dois dentre os valores antecedentes, por peso, de um álcool graxo que inclui uma cadeia de carbono que tem 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22 carbonos de comprimento. Tais composições tensoativas ou detergentes também podem incluir pelo menos um aditivo, tal como uma microemulsão, um tensoativo ou um detergente, de fontes não microbianas tais como óleos vegetais ou petróleo, que podem estar presentes na quantidade de pelo menos cerca de 5%, pelo menos cerca de 10%, pelo menos cerca de 15%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 85%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 95% ou em uma faixa limitada por quaisquer dois dentre os valores antecedentes, por peso do álcool graxo. Os ésteres possuem muitos usos comerciais. Por exemplo, o biodiesel, um combustível alternativo, é composto de ésteres (por exemplo, ésteres metílicos de ácido graxo, ésteres etílicos de ácido graxo, etc.). Alguns ésteres de baixo peso molecular são voláteis e têm um cheiro agradável, o que os torna úteis como fragrâncias ou agentes

aromatizantes. Adicionalmente, os ésteres são usados como solventes para lacas, tintas e vernizes. Ademais, algumas substâncias de ocorrência natural, tais como ceras, gorduras e óleos são compostos de ésteres. Os ésteres são usados também como agentes amaciantes em resinas e plastificantes, retardantes de chamas e aditivos em gasolina e óleo. Adicionalmente, os ésteres podem ser usados na fabricação de polímeros, filmes, produtos têxteis, corantes e substâncias farmacêuticas. Os hidrocarbonetos possuem muitos usos comerciais. Por exemplo, alcanos de cadeia mais curta são usados como combustíveis. Os alcanos de cadeia mais longa (por exemplo, que possuem de cinco a dezesseis carbonos) são usados como combustíveis de transporte (por exemplo, gasolina, diesel, ou combustível de aviação). Os alcanos que têm mais do que dezesseis átomos de carbono são componentes importantes de óleos combustíveis e óleos lubrificantes. Os alcanos ainda mais longos, que são sólidos em temperatura ambiente, podem ser usados, por exemplo, como uma cera de parafina. Adicionalmente, alcanos de cadeia mais longa podem ser craqueados para produzir hidrocarbonetos de cadeia mais curta comercialmente valiosos. Assim como alcanos de cadeia curta, alcenos de cadeia curta são usados em combustíveis de transporte. Os alcenos de cadeia mais longa são usados em plásticos, lubrificantes, e lubrificantes sintéticos. Adicionalmente, os alcenos são usados como uma matéria-prima para produzir álcoois, ésteres, plastificantes, tensoativos, aminas terciárias, agentes de recuperação aprimorada de óleo, ácidos graxos, tióis, anidridos alcenilsuccínicos, epóxidos, alcanos clorados, alcenos

clorados, ceras, aditivos de combustível e redutores de fluxo de arraste. As cetonas são usadas comercialmente como solventes. Por exemplo, a acetona frequentemente é usada como um solvente, mas é também um material bruto para produzir polímeros. As cetonas são usadas também em lacas, tintas, explosivos, perfumes e no processamento têxtil. Adicionalmente, as cetonas são usadas para produzir álcoois, alcenos, alcanos, iminas e enaminas. Os lubrificantes são tipicamente compostos de olefinas, particularmente poliolefinas e alfa-olefinas. Os lubrificantes podem ser tanto refinados de petróleo bruto quanto fabricados com o uso de materiais brutos refinados de petróleo bruto. A obtenção dessas substâncias químicas especiais a partir de petróleo bruto requer um investimento financeiro significativo, assim como uma grande quantidade de energia. Esse processo também é ineficiente devido ao fato de que, frequentemente, os hidrocarbonetos de cadeia longa em petróleo bruto são craqueados para produzir monômeros menores. Esses monômeros são então usados como o material bruto para a fabricação de substâncias químicas especiais mais complexas. A revelação é adicionalmente ilustrada pelos exemplos seguintes. Os exemplos são fornecidos somente para propósitos ilustrativos. Os mesmos não devem ser interpretados como limitantes do escopo ou conteúdo da revelação de nenhuma forma.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1

Modificações em Hospedeiros de Produção - Atenuação de Acil-CoA Desidrogenase

[00115] Esse exemplo descreve a construção de uma

célula hospedeira geneticamente modificada, sendo que a expressão de uma enzima de degradação de ácido graxo é atenuada.

[00116] O gene *fadE* de *Escherichia coli* MG1655 (uma cepa K de *E. coli*) foi deletado com o uso do sistema Lambda Red (também conhecido como Integração Acionada por Red) descrito por Datsenko et al, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 1997: páginas 6640 a 6645 (2000), com as seguintes modificações:

[00117] Os dois iniciadores a seguir foram usados para criar a deleção de *fadE*:

Del-*fadE*-F

5' -

AAAAACAGCAACAATGTGAGCTTTGTTGTAATTATATTGTAAACATATTGATTCCGGGG
ATCCGTCGACC (SEQ ID NO: 9); e

Del-*fadE*-R

5' -

AAACGGAGCCTTTCCGGCTCCGTTATTCATTTACGCGGCTTCAACTTTCCTGTAGGCTGG
AGCTGCTTC (SEQ ID NO: 10)

[00118] Os iniciadores Del-*fadE*-F e Del-*fadE*-R foram usados para amplificar o cassette de resistência a canamicina (KmR) do plasmídeo pKD13 (descrito por Datsenko et al, supra) por PCR. O produto de PCR foi então usado para transformar células MG1655 eletrocompetentes de *E. coli* que contêm pKD46 (descrito em Datsenko et al., supra) que haviam sido previamente induzidas com arabinose de 3 a 4 horas. Em seguida a um crescimento de 3 horas em um caldo super ótimo com um meio de repressão catabólica (SOC) a 37°C, as células foram colocadas em placas de ágar de Luria que contêm 50 µg/ml de canamicina. Colônias resistentes

foram identificadas e isoladas após uma incubação durante a noite a 37 °C. A descaracterização do gene *fadE* foi confirmada por amplificação de PCR com o uso de dos iniciadores *fadE*-L2 e *fadE*-R1, que são projetados para flanquear o gene *fadE* de *E. coli*.

[00119] Os iniciadores de confirmação da deleção de *fadE* foram:

fadE-L2 5'-CGGGCAGGTGCTATGACCAGGAC (SEQ ID NO: 11); e

fadE-R1 5'-CGCGGCGTTGACCGGCAGCCTGG (SEQ ID NO: 12)

[00120] Após a deleção de *fadE* ter sido confirmada, uma única colônia foi usada para remover o marcador KmR com o uso do plasmídeo pCP20 conforme descrito por Datsenko et al., supra. A cepa MG1655 de *E. coli* resultante com o gene *fadE* deletado e o marcador KmR removido foi nomeada de MG1655 Δ *fadE* de *E. coli*, ou MG 1655 D1 de *E. coli*. A produção de derivados de ácido graxo (espécies graxas totais) pela cepa MG1655 de *E. coli* com o gene *fadE* deletado foi comparada com a produção de derivados de ácido graxo por MG1655 de *E. coli*. A deleção do gene *fadE* não afetou a produção de derivados de ácido graxo (Figura 7). Várias cepas de células hospedeiras exemplificativas são descritas no presente documento, das quais os exemplos são descritos abaixo na Tabela 3.

Tabela 3: Caracterização Genética de Cepas de *E. coli*

Cepa	Caracterização Genética
DV2	MG1655 F-, λ -, <i>ilvG</i> -, <i>rfb</i> -50, <i>rph</i> -1, Δ <i>fhuA</i> ::FRT,
DV2.1	DV2 <i>fabB</i> :: <i>fabB</i> [A329V]
D178	DV2.1 <i>entD</i> ::FRT _{P_{T5}} <i>entD</i>

EG149	D178 AinsH-11::PLAcuvs-iFAB138
V642	EG149 rph+
SL313	V642 lacIZ::P _{A1} 'tesA/pDG109
V668	V642 ilvG ⁺
LC397	V668 lacIZ:: P _{TRC} _tesA(var) kan
SL571	V668 lacIZ:: P _{TRC} 'tesA(var) FRT
LC942	SL571 attTn7::P _{mc} 'tesA(var)
DG16	LC942/pLC56
V940	LC397/pV171.1
D851	SL571 <i>yijP</i> ::Tn5-cat/pV171.1
BD64	DV2 AinsH-11::P _{LACUV5} -iFAB138 loxP_P _{T5} _fadR
DAM1	DV2 attTn7: :P _{TRC} _tesA_fadD
Shu.002	DV2 Δ insH-11::P _{T5} -iFAB138 loxP_P _{T5} _fadR

[00121] Os plasmídeos pDG109, pLC56 e pV171.1 são operões pCL_P_{trc}_carB_tesA_alrA_fabB_fadR com expressões variáveis de carB e tesA. O iFAB138 é o SEQ ID NO: 19.

EXEMPLO 2

Fluxo Aumentado Através da Trajetória Sintetizante de Ácido Graxo - Acetil-CoA Mediada por Carboxilase

Produção de Éster Graxo:

[00122] Os precursores principais para a biossíntese de ácido graxo são malonil-CoA e acetil-CoA (Figura 1). Tem sido sugerido que esses precursores limitam a taxa de biossíntese de ácido graxo em *E. coli*. Nesse exemplo, os operões *acc* sintéticos [accABCD ($\pm$ birA) de *Corynebacterium*

glutamicum] foram superexpressos e as modificações genéticas levaram à produção aumentada de acetil-CoA e malonil-CoA em *E. coli*. Em uma abordagem, a fim de aumentar os níveis de malonil-CoA, um complexo enzimático acetil-CoA carboxilase de *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*) foi superexpresso em *E. coli*. A acetil-CoA carboxilase (*acc*) consiste em quatro subunidades discretas, *accA*, *accB*, *accC* e *accD* (Figura 3). As vantagens de *C. glutamicum acc* são que duas subunidades são expressas como proteínas de fusão, *accCB* e *accDA*, respectivamente, o que facilita sua expressão equilibrada. Adicionalmente, o *birA* de *C. glutamicum*, que biotiniliza a subunidade *accB* (Figura 3) foi superexpresso. As sequências de DNA exemplificativas de *birA* de *C. glutamicum* são apresentadas como o SEQ ID NO: 55 e o SEQ ID NO: 56. Uma sequência de proteína *birA* de *C. glutamicum* é apresentada como o SEQ ID NO: 57.

[00123] Os operões sintéticos dos genes *acc* de *C. glutamicum* foram clonados da seguinte forma em OP80 (consulte W02008/119082 conforme incorporadas a título de referência ao presente documento) *P_{trc}1-accDACB*, *P_{trc}3-accDACB*, *P_{trc}1-accCBDA* e *P_{trc}3-CBDA*. *P_{trc}1* e *P_{trc}3* são derivados de do promotor *P_{trc}* comumente usado, que permite a transcrição atenuada dos genes-alvo. Deve-se verificar que as sequências nativas foram amplificadas a partir do DNA cromossômico dado que mostraram um uso favorável de códon (somente o códon para Arg6 em *accCB* foi alterado). O gene *birA* de *C. glutamicum* era um códon aperfeiçoado e obtido por síntese genética. O mesmo foi clonado a jusante dos genes *acc* em todas as quatro construções de operação. Abaixo, faz-se referência à configuração de operação *accDACB*

como accD- e à configuração de operação accDACB+birA como accD+. Os plasmídeos resultantes foram transformados em DAM1_i377 de *E. coli*, que contém cópias integradas (i) de tiosterease 'tesA sem sequência líder e fadD de acil-CoA sintetase de *E. coli* e éster sintase 9 (ES9) de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* (SEQ ID NO: 6). Todos os genes são controladores por promotores P_{trc}. As cepas foram desenvolvidas em meio 5NBT (descrita abaixo) em frascos de agitação e foram analisadas para malonil-CoA com o uso do ensaio de CoA de cadeia curta descrito abaixo. A Figura 8 mostra que seis das oito estruturas de acc±birA de *C. glutamicum* mostraram níveis elevados de malonil-CoA em fase logarítmica, o que demonstra sua funcionalidade em *E. coli*. Percebeu-se que a coexpressão de birA aumentou adicionalmente os níveis de malonil-CoA nas cepas P_{trc}1/3_accDACB, em particular com o plasmídeo que contém a configuração de operação P_{trc}3-accDACB-birA (plasmídeo pASl19.50D; SEQ ID NO: 62).

[00124] A fim de testar o efeito da combinação da superexpressão de panK com acc-birA, o gene panK aperfeiçoado foi clonado a jusante de birA em P_{trc}1/3_accDACB-birA. O pantotenato quinase panK (ou CoaA) catalisa a primeira etapa na biossíntese da coenzima A, um cofator essencial que está envolvido em muitas reações, por exemplo, na formação de acetil-CoA, o substrato para acetil-CoA carboxilase. Os plasmídeos resultantes foram transformados em DAM1_i377, desenvolvido em meio 5NBT (+TVS1) em frascos de agitação e as cepas foram analisadas para CoAs de cadeia curta com o uso do método descrito abaixo. Conforme mostrado na Figura 9, na fase

logarítimica, a coexpressão de *panK* aumentou adicionalmente os níveis de malonil-CoA e também aumentou os níveis de acetil-CoA, o que demonstra que *panK* pode aumentar adicionalmente os níveis de malonil-CoA. O impacto de coexpressar um complexo enzimático acetil-CoA carboxilase na produção de éster graxo foi avaliado expressando-se éster sintase 9 (SEQ ID NO: 6) com e sem genes *acc* em outro hospedeiro produtor *E. coli*. Mais especificamente, os plasmídeos OP80 (vetor de controle), pDS57 (com ES9), pDS57-*accD*- (com ES9 e *accDACB*) ou pDS57-*accD*+ (com ES9 e *accDACB*-*birA*; SEQ ID NO: 63) foram transformados na cepa DV2 de *E. coli* e os transformantes correspondente foram selecionados em placas LB suplementadas com 100 mg/l de espectinomicina.

[00125] Dois transformantes de cada plasmídeo foram inoculados de maneira independente no meio LB suplementado com 100 mg/l de espectinomicina e desenvolvidos por 5 a 8 horas a 32 °C. As culturas foram diluídas em 30 vezes em um meio mínimo com a seguinte composição: 0,5 g/l de NaCl, 1 mM de MgSO₄ x 7 de H₂O, 0,1 mM de CaCl₂, 2 g/l de NH₄Cl, 3 g/l de KH₂PO₄, 6 g/l de Na₂HPO₄, 1 mg/l de tiamina, 1x de solução de metal vestigial, 10 mg/l de citrato de ferro, 100 mM de Bis-Tris (pH7,0), 30 g/l de glicose e 100 mg/l de espectinomicina. Após o desenvolvimento durante a noite a 32 °C, as culturas foram diluídas em 10 vezes em quadruplicata em meio mínimo da mesma composição, exceto pelo fato de que o meio continha 1 g/l em vez de 2 g/l de NH₄Cl e foi suplementado com 1 mM de IPTG e metanol a 2% (v/v). As culturas resultantes foram então desenvolvidas a 32 °C em um agitador. A produção de ésteres metílicos de

ácido graxo (FAMES) foi analisada por cromatografia gasosa com um detector de ionização de chama (GC-FID). As amostras foram extraídas com acetato de butila em uma razão de 1:1 vol/vol. Após turbilhonamento, as amostras foram centrifugadas e a fase orgânica foi analisada por cromatografia gasosa (GC). As condições de análise foram conforme segue: instrumento: Trace GC Ultra, Thermo Electron Corporation com um Detector de Ionização de Chamas (FID); coluna: DB-1 (1% de difenil siloxano; 99% de dimetil siloxano) C01 UFM 1/0,1/5 01 DET da Thermo Electron Corporation, fase pH 5, FT: 0,4 µm, comprimento 5 m, diâmetro interno: 0,1 mm; condições de entrada: método sem separação a 250 °C, com separação a 3,8 m 1/25 usados dependendo da concentração da amostra com fluxo separado de 75 ml/m; gás carreador e sua taxa de fluxo: Hélio, 3,0 ml/m; temperatura de bloco: 330 °C; temperatura de forno: 0,5 m retido a 50 °C, 100 °C/m a 330 °C, 0,5 m retido a 330 °C; temperatura do detector: 300 °C; volume da injeção: 2 µl; tempo de execução/taxa de fluxo: 6,3 m/3,0 ml/m (método sem separação), 3,8 m/1,5 ml/m (método com separação de 1/25), 3,04 m/1,2 ml/m (método com separação de 1/50). Os FAMES produzidos são mostrados na Figura 10. A expressão de ES9 por si só em DV2 de *E. coli* levou à produção de FAME acima da DV2 OP80 de controle. A coexpressão do complexo carboxilase de *C. glutamicum* acetil-CoA levou a um aumento de 1,5 vez em FAMES e a expressão adicional da *C. glutamicum* ligase de proteína biotina levou a um aumento aproximado de 5 vezes em FAMES. Esses resultados sugerem que o provimento aumentado de malonil-CoA melhora a capacidade de ES9 de converter os intermediários de

maquinaria biossintetizante de ácido graxo em ésteres metílicos de ácido graxo em *E. coli*.

[00126] Ensaio de CoA de cadeia curta: Tubos falcon de 15 ml foram preparados com 0,467 ml de TCA a 10% com crotonil-CoA como padrão interno e sobrepostos com 2 ml de óleo de silicone. Os tubos foram arrefecidos em geral e um caldo de fermentação equivalente a 1 ml de OD600 = 31,2 foi cuidadosamente posto em cima do óleo de silicone. As amostras foram centrifugadas em 11.400 G a 4 °C por quatro ciclos de 4 minutos. Para cada amostra, uma alíquota de 400 µl de TCA/extrato celular foi removida e colocada em um tubo de Eppendorf novo para neutralização com 1 ml de Octilamina (em CHCl₃). Após o turbilhonamento, as amostras foram centrifugadas por 30 segundos em 13.000 G. 200 µl da camada superior foram filtrados com o uso de um filtro de seringa PTFE de 0,2 µm e então submetidos à análise LC-MS/MS.

Descrição do meio usado nos experimentos

ID de Meio						
4N-BT	5N-BT	FA2	FA2.1	FA2.3	Concentração	Ingrediente
0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	g/l	NaCl
2	2	2	2	2	g/l	NH ₄ Cl
3	3	3	3	3	g/l	KH ₂ PO ₄
6	6	6	6	6	g/l	Na ₂ PO ₄
1	1	1	1	1	mM	MgSO ₄
0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	mM	CaCl ₂
1	1	1	1	1	mg/l	tiamina
0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	M	Bis-Tris pH7
0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	%	Triton X-100

		5				
1	1	1	1	1	x	Minerais Residuais
27	27	10	10	10	mg/l	FeCl ₂ .6H ₂ O
40	50	30	30	35	g/l	glicose

Solução de Vitaminas Residuais concentradas 1.000 vezes

0,06 g/l de Riboflavina

6 g/l de Niacina

5,4 g/l de Ácido Pantotênico

1,4 g/l de Piridoxina

0,06 g/l de Biotina

0,01 g/l de Ácido Fólico

Solução de Metais Residuais concentrados 1.000 vezes

2 ml/l de Ácido clorídrico concentrado

0,5 g/l de Ácido Bórico

1,9 g/l de Sulfato de cobre, pentaidrato, USP

1 g/l de cloreto de zinco anidro

2 g/l de desidrato de molibdenato de sódio

2 g/l de desidrato cloreto de cálcio

Produção de Álcool Graxo:

[00127] O impacto da coexpressão do complexo enzimático acetil-CoA carboxilase na produção de Álcool graxo foi avaliada expressando-se a Acil-ACP redutase (AAR) a partir de *Synechococcus elongatus* (SEQ ID NO: 38) com e sem genes *acc* em DV2 de *E. coli*. A configuração de operação *accD+* foi selecionada dado que deu o melhor resultado quando coexpressa com éster sintase (consulte exemplo anterior). O operação *accDABC-birA* foi clonado a jusante do gene *aar* em pLS9-l85 (um derivado de pCL1920) com o uso da tecnologia Infusion (Clontech Laboratories, Inc., Mountain

View, CA). O plasmídeo resultante foi transformado em DV2 de *E. coli* e os transformantes correspondentes foram selecionados em placas LB suplementadas com 100 mg/l de espectomicina. Os álcoois graxos produzidos são mostrados na Figura 11. A coexpressão de AAR e accD+ levou a um aumento em 1,5 vez de ca. em titulações de álcool graxo em comparação com o controle somente com AAR (pLS9-185). Os dados foram reproduzíveis (amostras em triplicata foram mostradas). Esses resultados demonstraram que aumentar os níveis de malonil-CoA levou à produção melhorada de ácido graxo quando essa acil-ACP redutase é usada. Adicionalmente, o Exemplo 3 descreve a coexpressão de genes *acc* junto com operões *fab* inteiras.

EXEMPLO 3

Fluxo Aumentado Através da Trajetória Sintetizante de Ácido Graxo - iFABs

Produção de Derivado de Ácido Graxo

[00128] As estratégias para aumentar o fluxo através da trajetória sintética de ácido graxo em células hospedeiras recombinantes incluem tanto a superexpressão dos genes nativos de *E. coli* de biossíntese de ácido graxo quanto a expressão de genes exógenos de biossíntese de ácido graxo a partir de diferentes organismos em *E. coli*. Nesse estudo, os genes biossintetizantes de ácido graxo a partir de diferentes organismos foram combinados com o genoma de DV2 de *E. coli* (Tabela 3) sob o controle do promotor *lacUV5* e integrados no sítio IS5-11. Dezesseis cepas que contêm iFABs 130 a 145 foram avaliadas. A estrutura detalhada de iFABs 130 a 145 é apresentada nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4: Componentes de diferente Espécies usados em iFABs 130 a 145

Abreviação	Descrição Completa
St_fabD	Gene fabD de <i>Salmonella typhimurium</i>
nSt_fabH	Gene fabH de <i>Salmonella typhimurium</i> com a RBS nativa
sSt_fabH	Gene fabH de <i>Salmonella typhimurium</i> com a RBS sintética
Cac_fabF	Gene fabF de <i>Clostridium acetobutylicum</i> (ATCC824)
St_fabG	Gene fabG de <i>Salmonella typhimurium</i>
St_fabA	Gene fabA de <i>Salmonella typhimurium</i>
St_fabZ	Gene fabZ de <i>Salmonella typhimurium</i>
BS_fabI	Gene fabI de <i>Bacillus subtilis</i>
BS_FabL	Gene fabL de <i>Bacillus subtilis</i>
Vc_FabV	Gene fabV de <i>Vibrio cholerae</i>
Ec_FabI	Gene fabI de <i>Escherichia coli</i>

[00129] Cada "iFAB" incluiu vários genes fab na seguinte ordem: 1) Uma enoil-ACP redutase (BS_fabI, BS_FabL, Vc_FabV ou Ec_FabI); 2) Uma b-cetoacil-ACP sintetase III (St_fabH); 3) Uma malonil-CoA-ACP transacilase (St_fabD); 4) Uma b-cetoacil-ACP redutase (St_fabG); 5) Uma 3-hidróxi-acil-ACP desidratase (St_fabA ou St_fabZ); 6) Uma b-cetoacil-ACP sintetase II (Cac_fabF). Deve-se verificar que St_fabA também tem atividade de *trans*-2, *cis*-3-decenoil-ACP isomerase e que Cac_fabF tem as atividades de b-cetoacil-ACP sintetase II e b-cetoacil-ACP sintetase I (Zhu et al., BMC Microbiology 9: página 119 (2009)). Consulte a Tabela 5, abaixo, para a composição específica de iFABs 130 a 145.

Tabela 5: Composição de iFABs 130

ifab	13S_f abI	13S_f abL	Vc_f abV	Ec fa bI	nSt_f abH	sSt_f abH	St_f abD	St_f abG	St_f abA	St_f abZ	Cac_f abF
ifab 130	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1
ifab 131	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1
ifab 132	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1
ifab 133	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1
ifab 134	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1
Ifab 135	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1
ifab 136	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1
ifab 137	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1
ifab 138	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1
Ifab 139	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1
ifab 140	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1
ifab 141	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1
ifab 142	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1

Ifab 143	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1
ifab 144	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1
ifab 145	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1

[00130] O plasmídeo pCL_Ptrc_tesA foi transformado em cada uma das cepas e uma fermentação foi desempenhada em meio FA2 com 20 horas da indução para realizar uma colheita tanto a 32 °C quanto a 37 °C. Os dados para a produção de espécies graxas totais a partir de triagens de placa em duplicada são mostrados nas Figuras 12A e 12B. A partir dessa triagem, determinou-se que a melhor construção era DV2 com iFAB138. A sequência de iFAB138 no genoma de EG149 é apresentada como o SEQ ID NO: 19.

Produção de Éster Graxo:

[00131] Um operão fab totalmente sintético foi integrado em cromossomo de *E. coli* e avaliado para produção aumentada de FAME por expressão em DAM1 pDS57 de *E. coli*. Adicionalmente, quatro operões acc sintéticos de *Corynebacterium glutamicum* foram coexpressos e avaliados para produtividade melhorada de FAME. Várias cepas que produziam FAMES em uma taxa mais rápida e em titulações maiores foram obtidas. Os dezesseis operões iFAB diferentes (Tabela 5) foram colocados sob o controle do promotor lacUV5 e integrados no sítio IS5-11 de DAM1 de *E. coli*. Essas cepas foram nomeadas DAM1 ifab130 a igab145. As mesmas foram transformadas ou com pDS57 (que contem éster sintase 377) ou com pDS57 que coexpressa versões diferentes de operões acc (consulte acima) para a avaliação de

produção FAME. Os plasmídeos exemplificativos são descritos na Tabela 6.

Tabela 6: Os plasmídeos que contêm éster Sintase ES9 (de *Marinobacter hydrocarbonclasticus*) e operões *acc* sintéticos (de *Corynebacterium glutamicum*)

Plasmídeo	Genes
pTB.071	pDS57- <i>accCBDA</i>
pTB.072	pDS57- <i>accCBDA-birA</i>
pTB.073	pDS57- <i>accDACB</i>
pTB.074	pDS57- <i>accDACB-birA</i>

pDS57 = pCL_ptrc- ES9

[00132] As cepas ifab de DAM1 foram analisadas em placas de 96 cavidades (meio 4NBT), frascos de agitação (meio 5NBT) (consulte acima para descrição do meio) e em fermentadores a 32 °C. Os melhores resultados foram obtidos em placas de 96 cavidades e em frascos de agitação, em que várias ifab de DAM1 com plasmídeos pDS57-*acc-birA* mostraram titulações maiores de FAME. Em particular, ifab131, ifab135, ifab137, ifab138 e ifab143 de DAM1 com pDS57-*accDACB-birA* mostraram titulações melhorados de 20 a 40%, o que indica que atingiu-se um maior fluxo através das trajetórias de ácido graxo nessas cepas, o que resultou em uma taxa de formação de produto melhor (esses resultados foram reproduzíveis em vários experimentos independentes).

Efeito da Superexpressão de *FabH* e *FabI* na Produção de Éster Metílico De Ácido Graxo (FAME)

[00133] As estratégias para aumentar o fluxo através da trajetória sintética de ácido graxo em células hospedeiras recombinantes incluem tanto a superexpressão de genes nativos de biossíntese de ácido graxo quanto a

expressão de genes heterólogos de biossíntese de ácido graxo. FabH e fabI são duas enzimas biossintetizantes de ácido graxo que demonstrou-se serem inibidas por retroalimentação (Heath e Rock, JBC 271 : páginas 1833 a 1836 (1996)). Um estudo foi conduzido para determinar se FabH e FabI podem ser limitantes da taxa de produção de FAME. Os homólogos de fabH e fabI (de *E. coli*, *B. subtilis*, ADP1 de *Acinetobacter baylyi*, VT8 de *Marinobacter aquaeoli* e *Rhodococcus opacus*) foram superexpressos como um operão sintético e avaliados em DAM1 pDS57 de *E. coli* (uma cepa que observou-se ser uma boa produtora de FAME). Em uma abordagem, os operões fabH e fabI foram construídos a partir de organismos que acumulam ceras (*A. baylyi*, *M. aquaeoli*) ou triacilglicerídeos (*R. opacus*) e integrados no cromossomo de DAM1 pDS57 de *E. coli*. Em uma abordagem relacionada, operões *acc* sintéticos de *C. glutamicum* foram coexpressos (conforme descrito no Exemplo 2, acima). Onze operões fabHI diferentes foram construídos (dispostos *in vitro*) conforme resumido na Tabela 7. Os operões fabHI foram colocados sobre o controle de promotor lacUV5 induzível por IPTG e integrados no sítio IS5-11 de DAM1 de *E. coli*. Essas cepas foram nomeadas conforme mostrado na Tabela abaixo. As mesmas foram transformadas ou com pDS57 (que contém éster sintase 377) ou com pDS57 que coexpressa versões diferentes de operões *acc* para a avaliação da produção de FAME.

Tabela 7: Genótipo de Operões fabHI Integrados

Cepa	Genótipo do operão fab adicional	Plasmídeo
stEP117	DAM1 A _{in} SH::P _{LACUV5} (snyRBS) EcfabH (snyRBS) BsfabI::kan	pDS57

stEP118	DAM1 A _{in} SH::P _{LACUV5} (snyRBS) EcfabH (synRBS) BsfabL::kan	pDS57
stEP127	DAM1 A _{in} SH::P _{LACUV5} (EcrBS) EcfabH (EcrBS) BsfabI::kan	pDS57
stEP128	DAM1 A _{in} SH::P _{LACUV5} (EcrBS) EcfabH (EcrBS) BsfabL::kan	pDS57
stEP129	DAM1 A _{in} SH::P _{LACUV5} (EcrBS) ADP1fabH (EcrBS) ADP1fabI::kan	pDS57
stEP130	DAM1 A _{in} SH::P _{LACUV5} (snyRBS) ADP1fabH (synRBS) ADP1fabI::kan	pDS57
stEP131	DAM1 A _{in} SH::P _{LACUV5} (snyRBS) VT8fabH1 (synRBS) VT8fabI::kan	pDS57
stEP132	DAM1 A _{in} SH::P _{LACUV5} (snyRBS) VT8fabH2 (synRBS) VT8fabI::kan	pDS57
stEP133	DAM1 A _{in} SH::P _{LACUV5} (EcrBS) VT8fabH1 (synRBS) VT8fabI::kan	pDS57
stEP134	DAM1 A _{in} SH::P _{LACUV5} (EcrBS) VT8fabH2 (synRBS) VT8fabI::kan	pDS57
stEP151	DAM1 A _{in} SH::P _{LACUV5} (snyRBS) RofabI (synRBS) RofabH::kan	pDS57
stEP153	DAM1 A _{in} SH::P _{LACUV5} (EcrBS) ADP1fabH (EcrBS) ADP1fabI::kan	pDS57 - accCBDA
stEP154	DAM1 A _{in} SH::P _{LACUV5} (EcrBS) ADP1fabH (EcrBS) ADP1fabI::kan	pDS57 - accDACB
stEP155	DAM1 A _{in} SH::P _{LACUV5} (EcrBS) ADP1fabH (EcrBS) ADP1fabI::kan	pDS57 - accCBDA - birA
stEP156	DAM1 A _{in} SH::P _{LACUV5} (EcrBS) ADP1fabH (EcrBS) ADP1fabI::kan	pDS57 - accDACB - birA

stEP157	DAM1 A _{in} SH::P _{LACUV5} (snyRBS) EcfabH (synRBS) BsfabI::kan	pDS57- accCBDA
stEP158	DAM1 A _{in} SH::P _{LACUV5} (snyRBS) EcfabH (synRBS) BsfabI::kan	pDS57- accCBDA- birA
stEP159	DAM1 A _{in} SH:: P _{LACUV5} (EcrBS) EcfabH (synRBS) BsfabI::kan	pDS57- accCBDA
stEP160	DAM1 A _{in} SH:: P _{LACUV5} (EcrBS) EcfabH (synRBS) BsfabI::kan	pDS57- accCBDA- birA
stEP161	DAM1 A _{in} SH::P _{LACUV5} (EcrBS) VT8fabH1 (synRBS) VT8fabI::kan	pDS57- accCBDA
stEP162	DAM1 A _{in} SH::P _{LACUV5} (EcrBS) VT8fabH1 (synRBS) VT8fabI::kan	pDS57- accCBDA- birA
stEP163	DAM1 A _i nSH::P _{LACUV5} (EcrBS) VT8fabH2 (synRBS) VT8fabI::kan	pDS57- accCBDA
stEP164	DAM1 A _{in} SH::P _{LACUV5} (EcrBS) VT8fabH2 (synRBS) VT8fabI::kan	pDS57- accCBDA- birA

Bs: *Bacillus subtilis*; Ec: *Escherichia coli*; ADP1 : *Acinetobacter sp. ADP1*; VT8: *Marinobacter aquaeolei* VT8;
Ro: *Rhodococcus opacus* B4

[00134] As cepas ifabHI DAM1 foram analisadas em placas de 96 cavidades (em meio 4NBT), frascos de agitação (em meio 5NBT) e em fermentadores a 32 °C. Em um frasco de agitação, várias cepas ifabHI que portam o plasmídeo pDS57 tiveram melhor desempenho do que a cepa de controle DAM1 pDS57, atingindo de 10 a 15% de titulações de FAME maiores (Figura 13). Um aumento adicional em titulações de FAME foi

obtido quando cepas iFabHI foram transformadas com plasmídeos pDS57-acc-birA, em particular um aumento de 50% em titulações de FAME foi observado na cepa StEP156 (DAM1 IS5-11::1acUV5(ecRBS)ADPlfabH(ecRBS)ADP1fabI pDS57-accDACB-birA) (Figura 14).

[00135] Algumas das cepas com iFabHI foram executadas em fermentadores, em que um aumento em titulações de FAME, especificamente de produtividade e rendimento, foram também observadas (Figura 15), o que indica que nessas cepas, obteve-se um fluxo maior através de trajetória de ácido graxo, o que resultou em uma taxa de formação de produto melhor. Em particular, stEP129 (DAM1 5-11::UV5(ecRBS)ADPlfabH(ecRBS)ADP1fabI pDS57) mostrou titulações maiores de FAME e rendimento em várias execuções independentes de fermentação. Outras combinações de fabH e fabI podem ser usadas para atingir efeitos similares. Apesar de FAME ser exemplificado aqui, essa abordagem para alterar genes biossintetizantes de ácido graxo é uma abordagem útil para aumentar a produção de qualquer derivado de ácido graxo.

Efeito da Inserção de um Promotor Forte à Frente do Operão FAB 138 na Produção de Éster Metílico de Ácido Graxo (FAME):

[00136] O promotor lacUV5 de iFAB 138 foi substituído por um promotor T5 (SEQ ID NO: 2) o que levou a níveis maiores de expressão de iFAB 138, conforme confirmado por análise de mRNA. A expressão de iFAB138 do promotor T5 resultou em uma maior titulação, rendimento e produtividade de ésteres graxos. A cepa shu.002 (Tabela 3) é isogênica à cepa BD64 (Tabela 3), exceto por conter o

promotor T5 no controle da expressão do operão iFAB138 (SEQ ID NO: 19).

Tabela 8: Iniciadores usados para Gerar Cassete iT5 138 e Verificar sua Inserção em Novas Cepas

Nome do Iniciador	SEQ ID NO	Sequência
DG405	20	TTGTCCATCTTTATATAATTTGGGGGTAGGGTGTCTTTATGTA AAAAAACGTTTTAGGATGCATATGGCGGCC
DG406	21	GATAAATCCACGAATTTTAGGTTTGATGATCATTGGTCTCCTC CTGCAGGTGCGTGTCGTCGTCATCGCAATTG
DG422	22	ACTCACCGCATTGGTGTAGTAAGGCGCACC
DG423	23	TGAATGTCATCACGCAGTTCCCAGTCATCC
EG744	24	CCATCTTCTTTGTACAGACGTTGACTGAACATG
EG749	24	GCACCATAGCCGTAATCCCACAGGTTATAG
OTREE047	26	TGTCATTAATGGTTAATAATGTTGA

[00137] Os iniciadores DG405 e DG406 (Tabela 8) foram usados para amplificar um cassette promotor cat-loxP e T5 com a adição de 50 bp de homologia a cada extremidade do produto de PCR, de forma que pudessem ser integrados em qualquer cepa substituindo a expressão reguladora do promotor lacUV5 do operão iFAB138. O promotor cat-loxP-T5 foi transformado na cepa BD64/pKD46. Os transformantes foram recuperados em placas LB + cloranfenicol a 37 °C durante a noite, juntados a uma nova placa LB + cloranfenicol e verificados por PCR de colônia com o uso dos iniciadores DG422 e DG423. O plasmídeo pJW168 (Palmeros et al, Gene 247: páginas 255 a 264 (2000)) foi transformado na cepa BD64 i-cat-loxP-T5_138 e selecionado em placas LB + carbenicilina a 32 °C. A fim de remover o marcador cat, a expressão da cre-recombinase foi induzida por IPTG. O

plasmídeo pJW168 foi removido por culturas em desenvolvimento a 42 °C. As colônias foram juntadas em LB + cloranfenicol e LB + carbenicilina para verificar a perda de pJW168 e a remoção do marcador cat, respectivamente. A colônia foi também juntada em LB como um controle positivo, todas as placas juntadas foram incubadas a 32 °C. A remoção do marcador cat foi confirmada por PCR de colônia com o uso de iniciadores DG422 e DG423. O produto resultante do PCR foi verificado por sequenciamento com iniciadores EG744, EG749 e oTREE047, a cepa foi chamada de shu.002. A Figura 16 mostra o locus iFAB138: um diagrama do cassette cat-loxP-P_{T5} integrado na frente da FAB 138 (Figura 16 A) e um diagrama da região P_{T5}_iFAB138 (Figura 16B). A sequência do promotor cat-loxP-T5 integrado na frente do iFAB138 com homologia ao sítio de integração é apresentada como SEQ ID NO: 1 e a sequência da região promotora iT5_FAB138 com homologia ao sítio de integração é apresentada como o SEQ ID NO: 2. Há várias condições que podem levar ao aumento de fluxo de ácido graxo. Nesse exemplo, o fluxo de ácido graxo aumentado foi atingido alterando-se a força do promotor do operão iFAB138. A expressão de iFAB138 a partir do promotor T5 foi benéfica, em todo caso, quando essa alteração de promotor foi combinada com a inserção do cassette *yijP::Tn5*, melhorias adicionais foram observadas em titulação, rendimento e produtividade de ésteres de ácido graxo e de outros derivados de ácido graxo (dados não mostrados).

EXEMPLO 4

Aumento da Quantidade do Produto de Ácido Graxo Livre (FFA) Reparando-se as Mutações *rpg* e *iLvG*

[00138] As mutações *ilvG* e *rph* foram corrigidas nessa cepa, o que resultou em maior produção de FFA. As cepas EG149 e V668 (Tabela 3) foram transformadas com pCL_P_{trc}_tesA. A fermentação foi desempenhada a 32 °C em meio FA2 por 40 horas para comparar a produção de FFA das cepas EG149 e V668 com pCL_P_{trc}_tesA. Corrigir as mutações *rph* e *ilvG* resultou em um aumento de 116% na produção de FFA da cepa base com pCL_P_{trc}_tesA. Conforme visto na Figura 17, V668/ pCL_P_{trc}_tesA produziu mais FFA do que a EG149/ pCL_P_{trc}_tesA de controle. Dado que FFA é um precursor aos produtos LS9, a produção maior de FFA é um bom indicador de que a nova cepa pode produzir níveis maiores de produtos LS9.

EXEMPLO 5: Produção Aumentada de Derivados de Ácido Graxo por Mutagênese do Transposón *yijP*

Produção de Álcool Graxo:

[00139] Para melhorar a titulação, o rendimento e a produtividade da produção de álcool graxo por *E. coli*, a mutagênese de transpóson e a triagem de alta vazão foram desempenhadas e mutações benéficas foram sequenciadas. Mostrou-se que uma inserção de transpóson na cepa melhora o rendimento de álcool graxo da cepa tanto em fermentações de frasco de agitação quanto de batelada alimentada. A cepa SL313 produz álcoois graxos. O genótipo dessa cepa é fornecido na Tabela 3. Os clones de transpóson foram então submetidos à triagem de alta vazão para medir a produção de álcoois graxos. Brevemente, as colônias foram pescadas em placas de cavidades profundos que contêm LB, desenvolvidas durante a noite, inoculadas em LB novo e desenvolvidas por 3 horas, inoculadas em meio FA2.1 novo, desenvolvidas por

16 horas e então extraídas com o uso de acetato butílico. O extrato bruto foi derivado com BSTFA (N,O-bis[Trimetilsilil]trifluoroacetamida) e analisado com o uso de GC/FID. A espectomicina (100mg/l) foi incluída em todos os meios para manter a seleção do plasmídeo pDG109. As colocações foram selecionadas escolhendo-se os clones que produziram espécies graxas totais similares à cepa de controle SL313, mas que tiveram uma porcentagem maior de espécies de álcool graxo e uma porcentagem menor de ácidos graxos livres do que o controle. A cepa 68F11 foi identificada como uma colocação e foi validada em uma fermentação em frasco de agitação com o uso de meio FA2.1. Uma comparação da colocação de transpóson 68F11 com a cepa de controle SL313 indicou que 68F11 produz uma maior porcentagem de espécies de álcool graxo do que o controle, apesar de ambas as cepas produzirem titulações similares de espécies graxas totais. Uma única colônia da colocação 68F11, chamada de LC535, foi sequenciada para identificar a localização da inserção de transpóson. Brevemente, o DNA genômico foi purificado a partir de uma cultura LB de 10 ml durante a noite com o uso do conjunto ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ (Zymo Research Corporation, Irvine, CA) de acordo com as instruções do fabricante. O DNA genômico purificado foi sequenciado em direção ao lado de fora a partir do transpóson com o uso de iniciadores internos ao transpóson:

DG150 5'-GCAGTTATTGGTGCCCTTAAACGCCTGGTTGCTACGCCTG-3' (SEQ ID NO: 27)

DG131 5'-GAGCCAATATGCGAGAACACCCGAGAA-3' (SEQ ID NO: 28)

[00140] Determinou-se que a cepa LC535 tem uma

inserção de transpóson no gene *yijP* (Figura 18), sendo que o *yijP* codifica uma proteína conservada de membrana interna da qual a função é desconhecida. O gene *yijP* é em um operão e cotranscrito com o gene *ppc*, que codifica fosfoenolpiruvato carboxilase e o gene *yijO*, que codifica um regulador transcricional predito de ligação de DNA de função desconhecida. Os promotores internos ao transpóson provavelmente têm efeitos no nível e na temporização da transcrição de *yijP*, *ppc* e *yijO* e podem ter também efeitos nos genes adjacentes *frwD*, *pflC*, *pflD* e *argE*. Os promotores internos ao cassette de transpóson são mostrados na Figura 18 e podem ter efeitos na expressão gênica adjacente. A cepa LC535 foi avaliada em uma fermentação de batelada alimentada em duas datas diferentes. Ambas as fermentações demonstraram que LC535 produziu álcoois graxos com um rendimento maior do que o controle SL313 e que a melhora de 1,3 a 1,9% em rendimento absoluto com base na admissão de carbono. O cassette de transpóson *yijP* foi adicionalmente avaliado em uma cepa V940 diferente, que produziu álcool graxo em um rendimento maior do que a cepa SL313. O cassette *yijP*::Tn5-cat foi amplificado a partir da cepa LC535 com o uso dos iniciadores:

LC277 5'-CGCTGAACGTATTGCAGGCCGAGTTGCTGCACCGCTCCCGCCAGGCAG-3' (SEQ ID NO: 29)

LC278 5'-GGAATTGCCACGGTGCGGCAGGCTCCATACGCGAGGCCAGGTTATCCAACG-3' (SEQ ID NO: 30)

[00141] Esse DNA linear foi eletroporado na cepa SL571 e integrado no cromossomo com o uso do sistema de recombinação lambda red. As colônias foram triadas com o

uso de iniciadores fora da região transpóson:

DG407 5'-AATCACCAGCACTAAAGTGCGCGGTTTCGTTACCCG-3' (SEQ ID NO: 31)

DG408 5'-ATCTGCCGTGGATTGCAGAGTCTATTTCAGCTACG-3' (SEQ ID NO: 32)

[00142] Uma colônia com o cassette de transpóson yijP correto foi transformada com o plasmídeo pV171.1 de produção para produzir a cepa D851. A D851 foi testada em uma fermentação em frasco de agitação contra a cepa V940 que não contém o cassette de transpóson yijP. O resultado dessa fermentação mostrou que o cassette de transpóson yijP confere a produção de um percentual maior de álcool graxo pela cepa D851 em relação à cepa V940 e produz titulações similares de espécies graxas totais à cepa de controle V940. A cepa D851 foi avaliada em uma fermentação de batelada alimentada em duas datas diferentes. Os dados dessas fermentações são mostrados na Tabela 9 que ilustra que nas fermentações de batelada alimentada de 5 litros, as cepas com a inserção de transpóson yijP::Tn5-cat teve um aumento no rendimento de espécies graxas totais ("FAS") e um aumento no percentual de álcool graxo ("FALC "). Os termos "espécies graxas totais" e "produto total de ácido graxo" podem ser usados de maneira intercambiável no presente documento como uma referência à quantidade de álcoois graxos livres, aldeídos graxos e ácidos graxos conforme avaliado por GC-FID conforme descrito no Pedido de Patente Internacional WO 2008/119082. Os mesmos termos podem ser usados para significar ésteres graxos e ácidos graxos livres quando em referência a uma análise de éster graxo. Conforme usado no presente documento, o termo

"ésteres graxos" inclui beta hidróxi ésteres.

Tabela 9: Efeito da inserção de transpóson *yijP* na titulação e no rendimento de FAS e FALC

Cepa	Titulação de FAS	Rendimento de FAS	Percentual de FALC	Rendimento de FALC
V940	68 g/l	18,7%	95,0%	17,8%
D851	70 g/l	19,4%	96,1%	18,6%
V940	64 g/l	18,4%	91,9%	16,9%
D851	67 g/l	19,0%	94,0%	17,8%

Método de Tanque de Fermentação:

[00143] Para determinar a produção de ácido graxo e derivados de ácido graxo em tanque, um frasco de glicerol da cepa desejada foi usado para inocular 20 ml de LB + espectomicina em frasco de agitação e incubado a 32 °C por aproximadamente seis horas. 4 ml da cultura de LB foram usados para inocular 125 ml de Inóculo de baixo PFA (abaixo), que foi então incubado a 32 °C em agitador durante a noite. 50 ml da cultura feita durante a noite foram usados para inocular 1 litro de Meio de Tanque. Os tanques foram executados em pH 7,2 e a 30,5 °C sob condições estáticas de pH com uma máxima taxa de alimentação de glicose de 16 g/l/h.

Tabela 10: Inóculo de baixo PFA:

Componente	Concentração
NH ₄ Cl	2 g/l
NaCl	0,5 g/l
KH ₂ PO ₄	1 g/l
MgSO ₄ -7H ₂ O	0,25 g/l
CaCl ₂ -2H ₂ O	0,015 g/l

Glicose	20 g/l
Solução de Minerais Vestigiais TM2	1 ml/l
Citrato férrico	10 mg/l
Tampão Bis Tris (pH 7,0)	100 mm
Espectinomicina	115 mg/l

Tabela 11: Media de Tanque

Componente	Concentração
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 g/l
KH ₂ PO ₄	3,0 g/l
Citrato Férrico	0,034 g/l
Solução de Minerais Vestigiais TM2	10 ml/l
Casaminoácidos	5 g/l
Adições Após Esterilização	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2,2 g/l
Solução de Vitaminas Vestigiais	1,25 ml/l
Glicose	5 g/l
Inóculo	50 ml/l

[00144] Estudos adicionais sugerem que a titulação e o rendimento melhorados de FAS e FALC nas cepas com a inserção de transpóson yijP é devido à redução na atividade de fosfoenolpiruvato carboxilase (ppc). Um ensaio de enzima ppc foi desempenhado in vitro nas seguintes cepas para avaliar essa hipótese.

- 1) Δppc = DG14 (LC942 $\Delta ppc::cat$ -sacB/pLC56)
- 2) wt-ppc = DG16 (LC942/pLC56)
- 3) yijP::Tn5 = DG18 (LC942 yijP::Tn5-cat/pLC56)

[00145] A atividade Ppc foi medida em células desenvolvidas em uma fermentação em frasco de agitação com o uso de um protocolo padrão de frasco de agitação em meio FA2.3 (descrito acima) e colhido de 12 a 16 horas após a indução. Aproximadamente 5 ml de células foram centrifugados e a pasta celular foi suspensa no BugBuster Protein Extraction Reagent (Novagen) com uma solução de coquetel de inibidor de protease. A suspensão celular foi incubada com agitação leve em um agitador por 20 minutos. Os resíduos celulares insolúveis foram removidos por centrifugação a 16.000 G por 20 minutos a 4 °C e depois o sobrenadante foi transferido a um novo tubo. A atividade ppc no lisado celular foi determinada por uma reação de acoplamento com citrato sintase com o uso da seguinte mistura de reação: acetil-CoA 0,4 mM, fosfoenolpiruvato 10 mM, monobromobimano 0,5 mM, MgCl₂ 5 mM, NaHCO₃ 10 mM e 10 unidades de citrato sintase de coração suíno em Tris-HCl a 100 mM (pH 8,0). A formação de CoA na reação com citrato sintase com o uso de oxaloacetato e acetil-CoA foi monitorada fotometricamente com o uso de derivação fluorescente de CoA com monobromobimano. Os resultados do ensaio de Ppc mostraram que o cassette de transpóson yijP::Tn5-cat diminuiu a atividade Ppc na célula em 2,7 vezes em comparação com células do tipo selvagem. As células com deleção de *ppc* não se desenvolveram bem e a atividade foi aproximadamente 10 vezes menor do que as células de tipo selvagem. Os resultados também indicaram que o rendimento da produção de álcool graxo mais alto requer um nível de expressão de Ppc menor do que o nível de tipo selvagem. Os dados proteômicos foram coletados para

determinar a abundância da proteína Ppc nas duas cepas com e sem o cassette de transpóson yijP::Tn5-cat. As amostras de proteína foram coletadas a partir das cepas V940 e D851 desenvolvidas em biorreatores sob condições padrão de produção de álcool graxo (descritas acima). As amostras foram tomadas em dois momentos diferentes: 32 e 48 horas e preparadas para análise.

[00146] A coleta de amostra e o isolamento de proteína foram desempenhados conforme segue:

[00147] 20 ml de caldo de fermentação foram coletados de cada biorreator em cada momento. As amostras foram arrefecidas bruscamente com PBS em temperaturas geladas e coletadas por centrifugação (4.500 rpm/10 minutos) a 4 °C. Grânulos celulares foram lavados com PBS em temperaturas geladas, centrifugados uma vez a mais e armazenados a -80 °C para processamento adicional.

[00148] A extração total de proteína foi efetivada com o uso de um protocolo de prensa francesa. Brevemente, os grânulos de célula foram ressuspensos em 7 ml de PBS em temperaturas geladas e submetidos à prensa francesa a 2.000 psi duas vezes para assegurar o lise completo das bactérias. As amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 10.000 rpm a 4 °C para separar células não lisadas e resíduos celulares da fração de proteína. A concentração total de proteína de lisado claro foi determinada com o uso de Reagente de Ensaio de proteína BCA. As amostras foram diluídas até uma concentração de 2 mg proteínas/ml e congeladas a -80 °C.

[00149] As amostras foram ressuspensas no tampão apropriado e tripsinizadas durante a noite a 37 °C e

lioofilizadas. As amostras fragmentadas de proteína foram identificadas com ácido acético de metilpiperazina isotopicamente enriquecida em temperatura ambiente por 30 minutos. As amostras identificadas foram separadas com o uso de cromatografia de líquido de troca catiônica e submetidas à análise de espectrometria de massa com o uso de um espectrômetro de massa de armadilha iônica. Os dados brutos foram normalizados com o uso de subtração de fundo e correção do viés.

[00150] Os dados proteômicos mostraram uma redução significativa na abundância relativa de proteína Ppc na cepa D851 quando em comparação com V940 em 32 horas e 48 horas. A D851 teve aproximadamente 15% dos níveis de Ppc da V940 em 32 horas e aproximadamente 35% dos níveis de Ppc de V940 em 48 horas. Esses dados mostraram que o cassette de transpóson *yijP::Tn5-cat* resultou em uma redução significativa na abundância de Ppc na célula. Isso sugere que os benefícios observados à produção de álcool graxo por cepas que portam a colocação de transpóson *yijP::Tn5-cat* é devido à redução da quantidade da proteína Ppc.

[00151] Esses resultados sugerem que alterar a atividade ppc pode melhorar o rendimento de derivados de ácido graxo. Há várias maneiras de alterar a expressão do gene ppc e a inserção de transpóson *yijP* é uma maneira de conseguir isso. Sem desejo de se prender à teoria, se o efeito da redução da atividade de fosfoenolpiruvato carboxilase for para limitar o fluxo de carbono através do ciclo TCA, uma pessoa poderia conseguir resultados similares diminuindo-se a atividade de citrato sintase (*gltA*) ou desacelerando-se o ciclo TCA diminuindo-se a

atividade de quaisquer das enzimas envolvidas no ciclo TCA.

EXEMPLO 6

Fluxo Aumentado Através da Produção de Álcool Graxo Mediada por Trajetória Sintetizante de Ácido Graxo e Proteína Carreadora de Acila (ACP)

[00152] Quando enzimas de trajetória terminal a partir de fontes outras que não a *E. coli* são expressas em *E. coli* como o hospedeiro heterólogo para converter Acila Graxa-ACPs em produtos, podem existir limitações no reconhecimento, na afinidade e/ou no desvio da enzima de trajetória recombinante a favor das acilas graxas-ACPs de *E. coli*. Deve-se verificar que apesar das proteínas ACP serem conservadas até certo ponto em todos os organismos, sua sequência primária pode diferir significativamente. Para testar essa hipótese, os genes ACP de várias cianobactérias foram clonados a jusante a partir da PCC7942 acil-ACP redutase (AAR) de *Synechococcus elongatus* presente em pLS9-185, que é um derivado de pCL1920. Adicionalmente, o gene *sfp* (nº de Acesso X63158; SEQ ID NO: 53) de *Bacillus subtilis*, que codifica uma fosfopanteteinil transferase com ampla especificidade de substrato, foi clonado a jusante dos genes *acp* respectivos. Essa enzima é envolvida na conversão do apo-ACP inativo em holo-ACP ativo. Os plasmídeos construídos são descritos na Tabela 12.

Tabela 12: Plasmídeos coexpressantes de ACP de Cianobactérias com e sem *sfp* de *B. subtilis* a jusante do PCC7942 AAR de *S. elongatus*

Plasmídeo Base	Fonte de ACP	SEQ ID NO DE ACP (DNA/Polipeptídeo)	Sem <i>sfp</i>	Com <i>sfp</i>
pLS9-185	<i>Synechococcus</i>	49/50	pDS168	pDS168S

	<i>elongatus</i> 7942			
pLS9-185	<i>Synechocystis sp.</i> 6803	45/46	pDS169	indisponível
pLS9-185	<i>Prochlorococcus</i> <i>marinus</i> MED4	47/48	pDS170	pDS170S
pLS9-185	<i>Nostoc punctiforme</i> 73102	43/44	pDS171	pDS171S
pLS9-185	<i>Nostoc sp.</i> 7120	51/52	pDS172	pDS172S

[00153] Todos os genes ACP foram clonados com um RBS sintético no sítio *EcoRI* imediatamente a jusante do gene *aar* em pLS9-185 com o uso da tecnologia InFusion (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA). O sítio *EcoRI* foi reconstruído a jusante do gene ACP. De maneira similar, o gene *sfp* de *B. subtilis* foi clonado por InFusion no sítio *EcoRI* junto com um RBS sintético. Todos os plasmídeos foram transformados em MG1655 DV2 de *E. coli* (Tabela 3). O controle para esses experimentos foi a expressão de AAR sozinha (pLS9-185). Os resultados dos experimentos padrão de fermentação em frasco de agitação são mostrados na Figura 19. Uma melhora significativa em titulações de álcool graxo foi observada em cepas que contêm os plasmídeos pDS171S, pDS172S, pDS168 e pDS169, o que demonstra que a superexpressão de ACP pode ser benéfica para a produção de álcool graxo, nesse caso presumivelmente devido ao auxílio no reconhecimento, na afinidade e/ou no desvio de acil-ACPs pela enzima heteróloga de trajetória terminal. (Consulte a Tabela 12 para a fonte das ACPs e presença ou ausência de *sfp*).

Produção de Ácido Graxo:

[00154] A fim de avaliar se a superexpressão de uma ACP pode também aumentar a produção de ácidos graxos livres, um gene ACP de cianobactéria com *sfp* foi amplificado a partir de pDS171s (Tabela 12) e clonado a jusante a partir de 'tesA em um vetor pCL. O operão resultante estava sob o controle do promotor *trc3*, que fornece níveis marginalmente inferiores de transcrição em comparação com o promotor de *trc* de tipo selvagem. A construção foi clonada em DV2 de *E. coli* e avaliada para a produção de ácido graxo. A cepa de controle continha os plasmídeo idênticos, mas sem a ACP de cionabactéria e o *sfp* de *B. subtilis*. Os resultados de um experimento padrão de fermentação em placa de microtitulação são mostrados na Figura 20. Uma melhora significativa na titulação de ácido graxo foi observada na cepa que coexpressa o ACP heterólogo, o que demonstra que a superexpressão de ACP pode ser benéfica para a produção de ácido graxo, nesse caso presumivelmente devido ao aumento no fluxo através da trajetória biossintética do ácido graxo.

REIVINDICAÇÕES

1. Célula hospedeira de *E. coli* recombinante **caracterizada** por compreender uma sequência de polinucleotídeo de SEQ ID NO: 43, 45, 47, 49, ou 51 que codifica um polipeptídeo de ACP de SEQ ID NO: 44, 46, 48, 50 ou 52, em que a dita célula hospedeira de *E. coli* recombinante produz uma composição derivada de ácido graxo compreendendo pelo menos um derivado de ácido graxo selecionado do grupo que consiste em ácido graxo, um éster graxo, um álcool graxo, um aldeído graxo, um alcano, uma olefina terminal, uma olefina interna e uma cetona.

2. Célula hospedeira de *E. coli* recombinante, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que a dita célula hospedeira de *E. coli* recombinante compreende ainda um polinucleotídeo de SEQ ID NO: 53 que codifica um polipeptídeo de SEQ ID NO: 54 que tem atividade de fosfopanteteinil transferase.

3. Célula hospedeira de *E. coli* recombinante, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que a dita célula hospedeira de *E. coli* recombinante compreende ainda um polinucleotídeo de SEQ ID NO: 58 e 60 que codifica um polipeptídeo de SEQ ID NO: 59 e 61 que tem atividade de accABCD.

4. Célula hospedeira de *E. coli* recombinante, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que a dita ACP é exógena à célula hospedeira de *E. coli*.

FIGURA 1

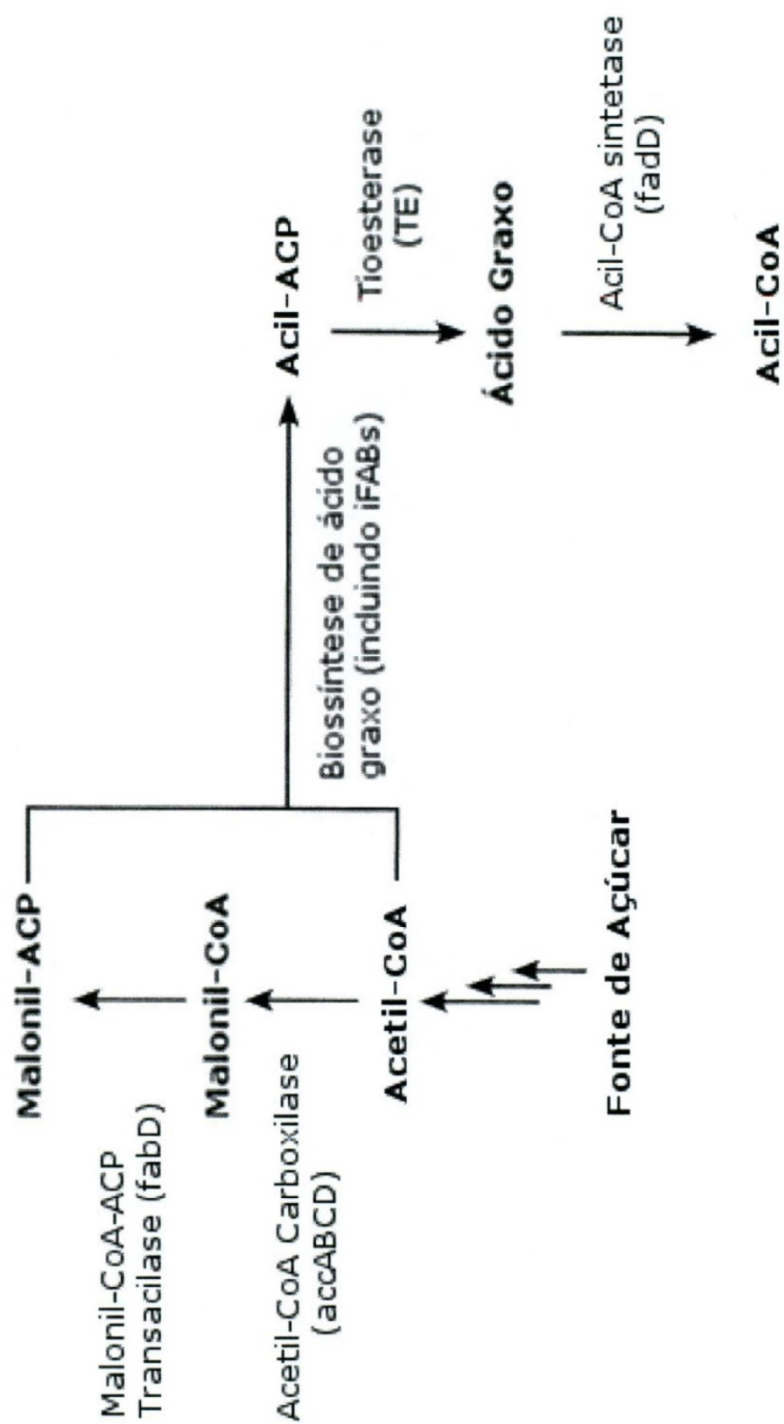


FIGURA 2

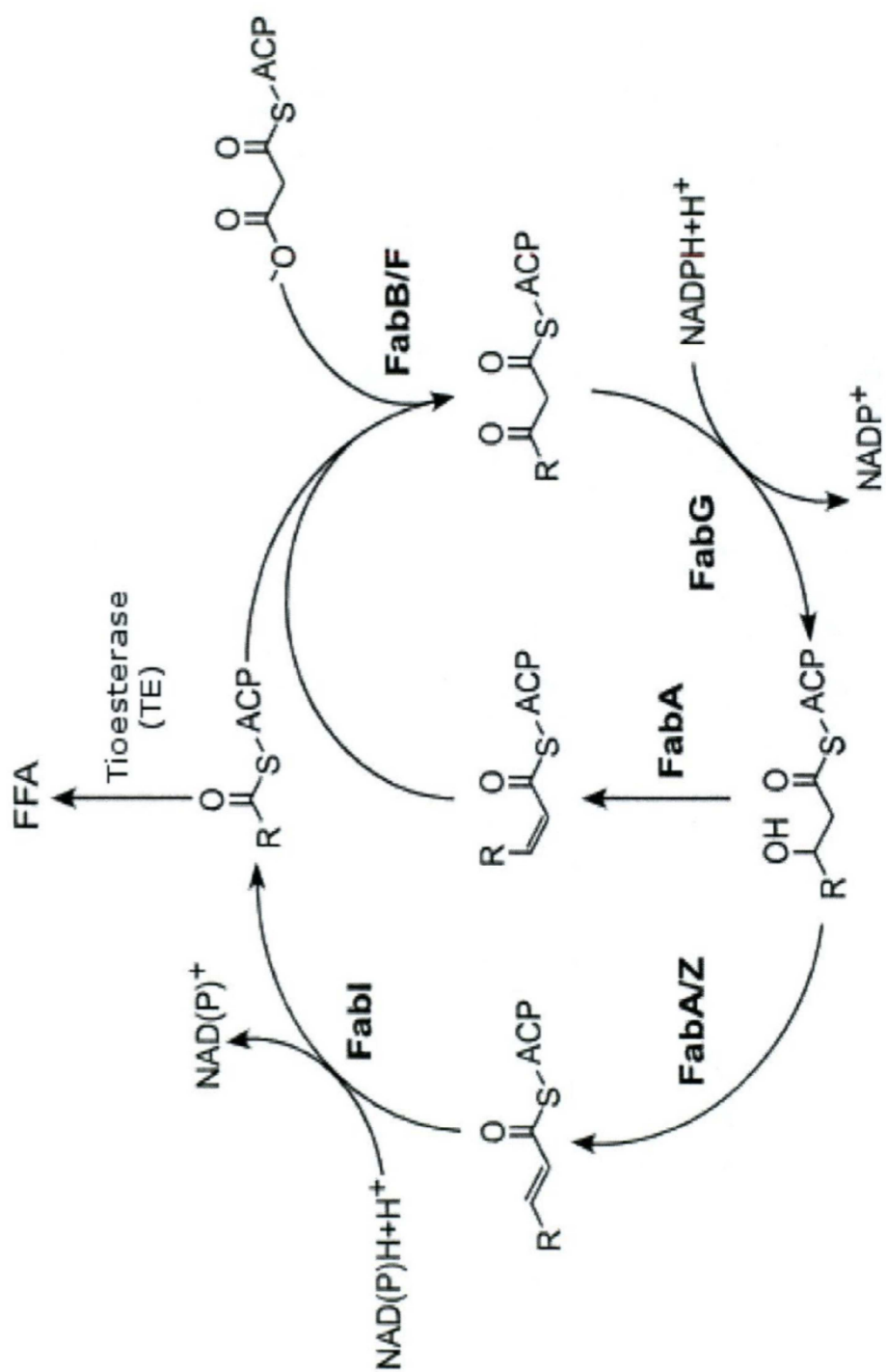


FIGURA 3

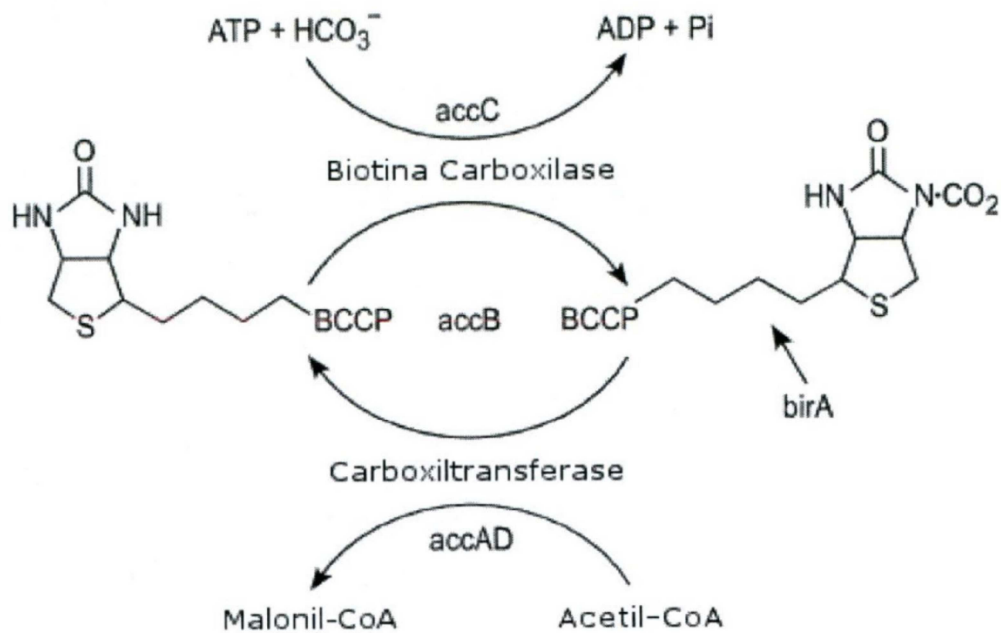


FIGURA 4

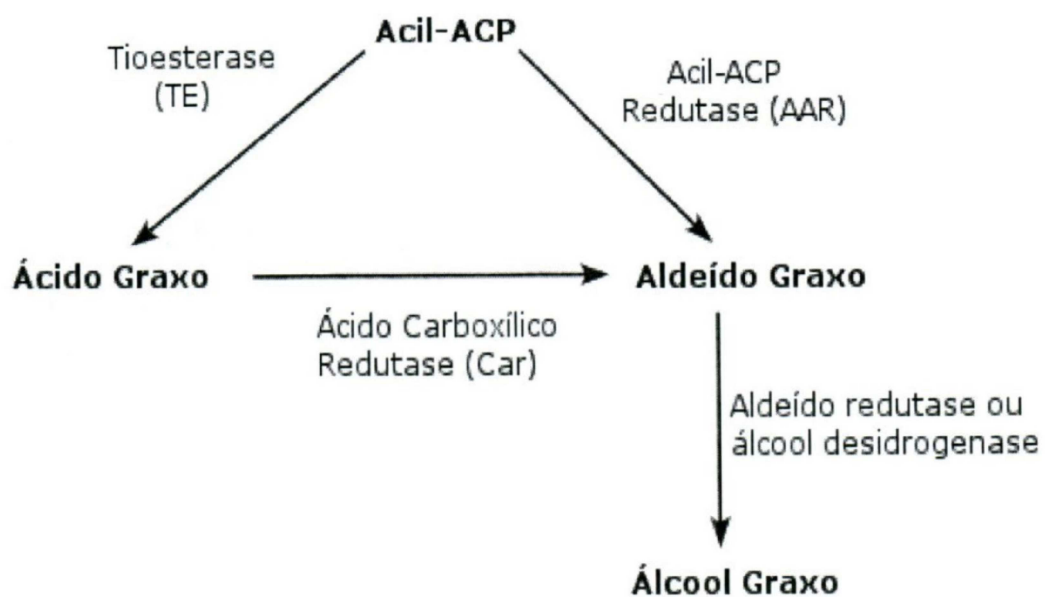
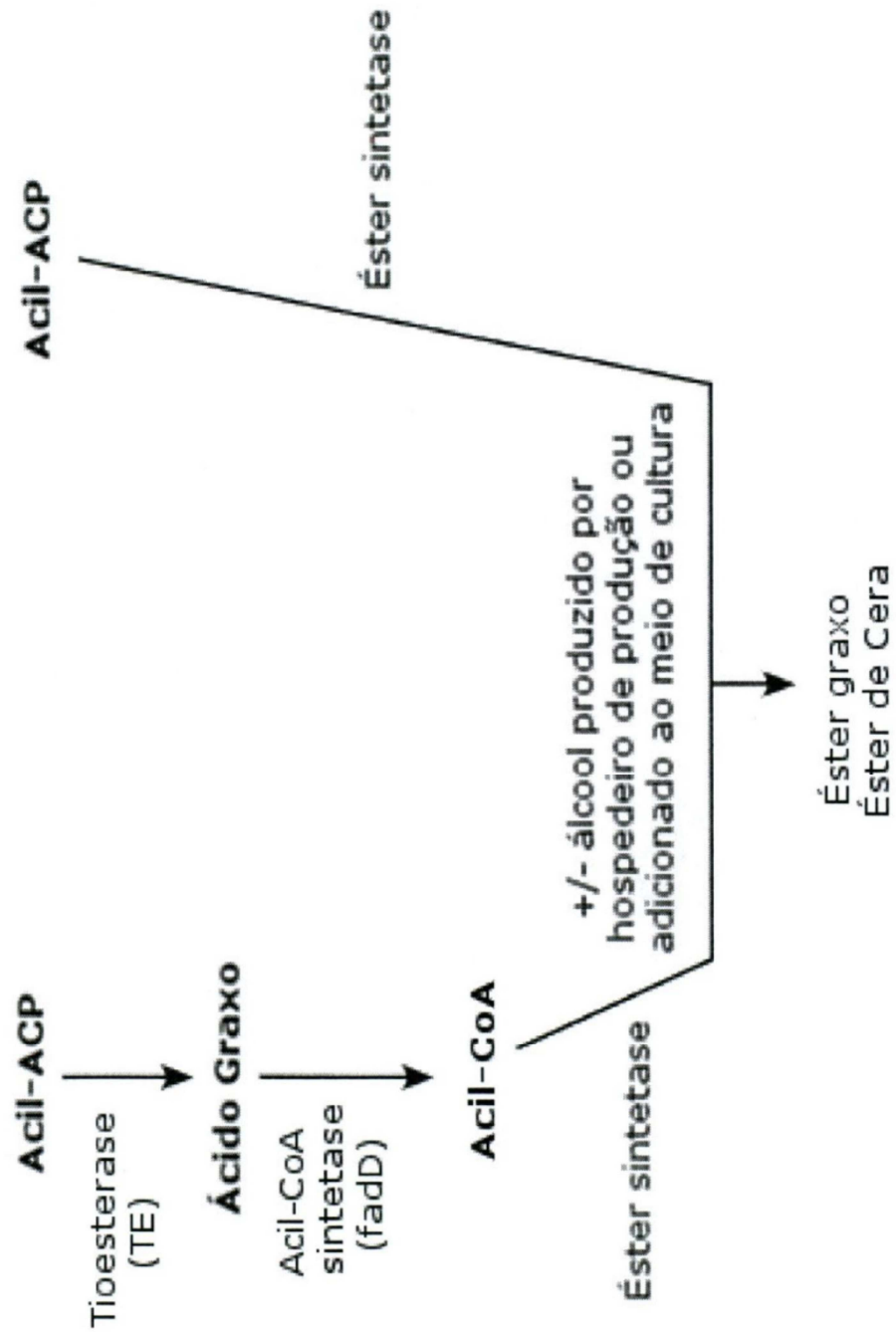


FIGURA 5

Sistema de Uma Enzima



Sistema de Três Enzimas

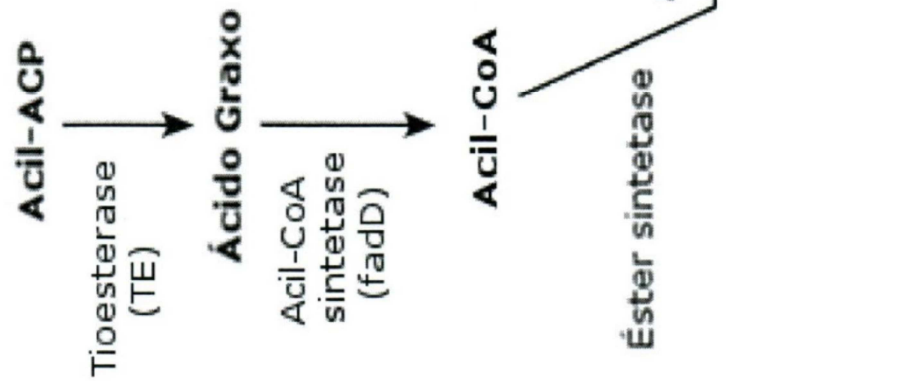


FIGURA 6

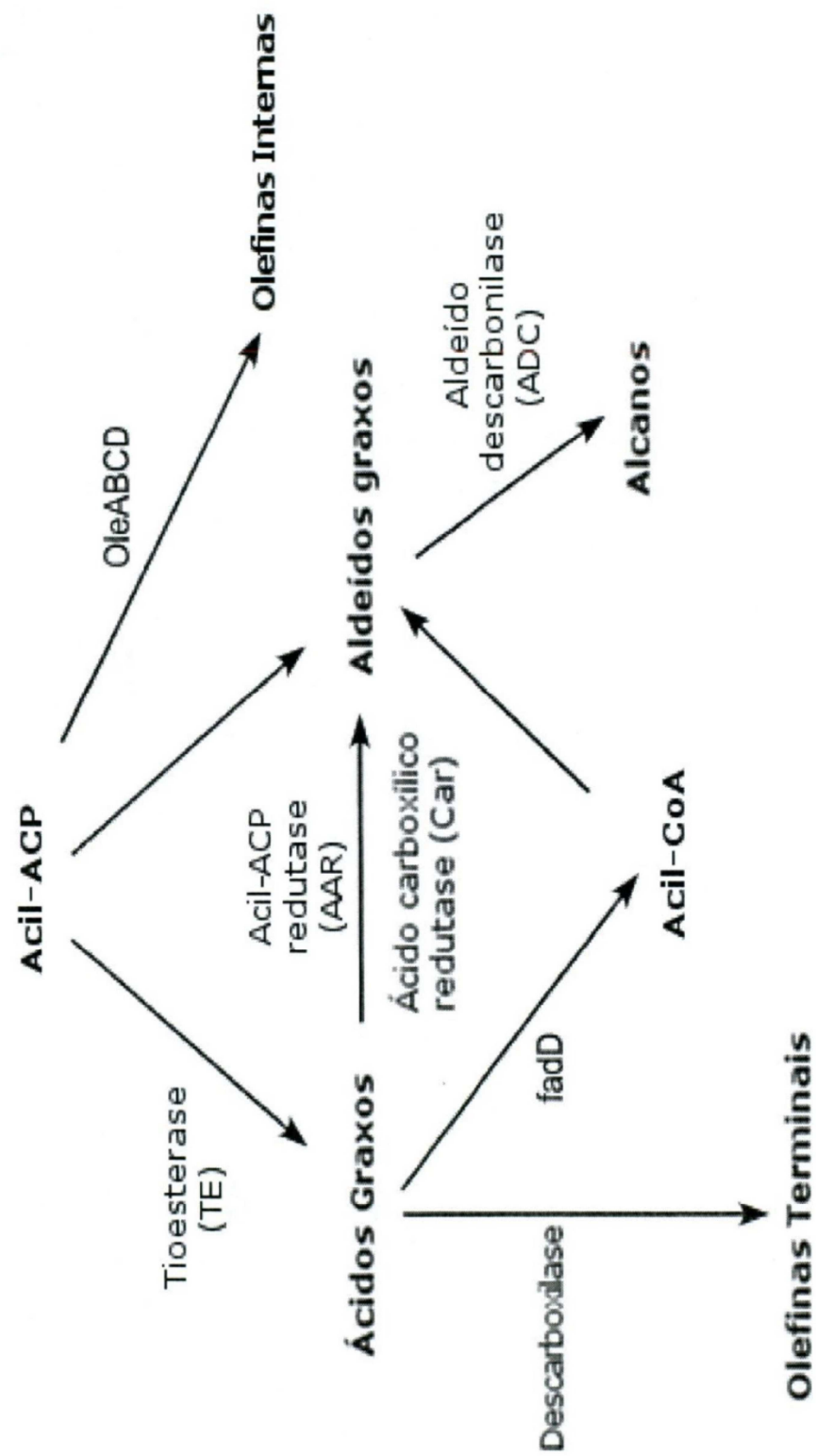


FIGURA 7

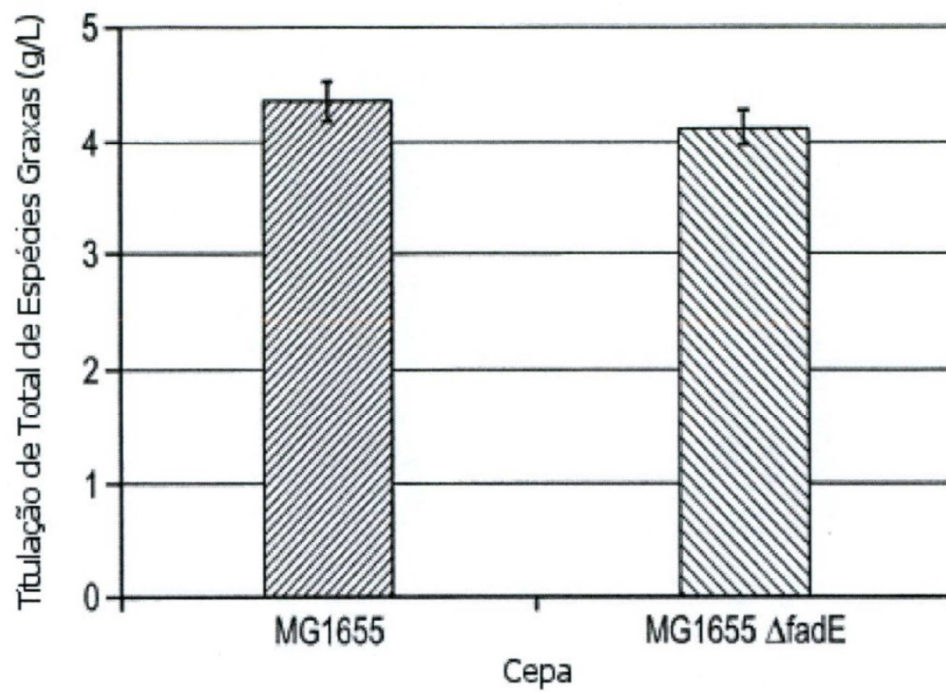


FIGURA 8

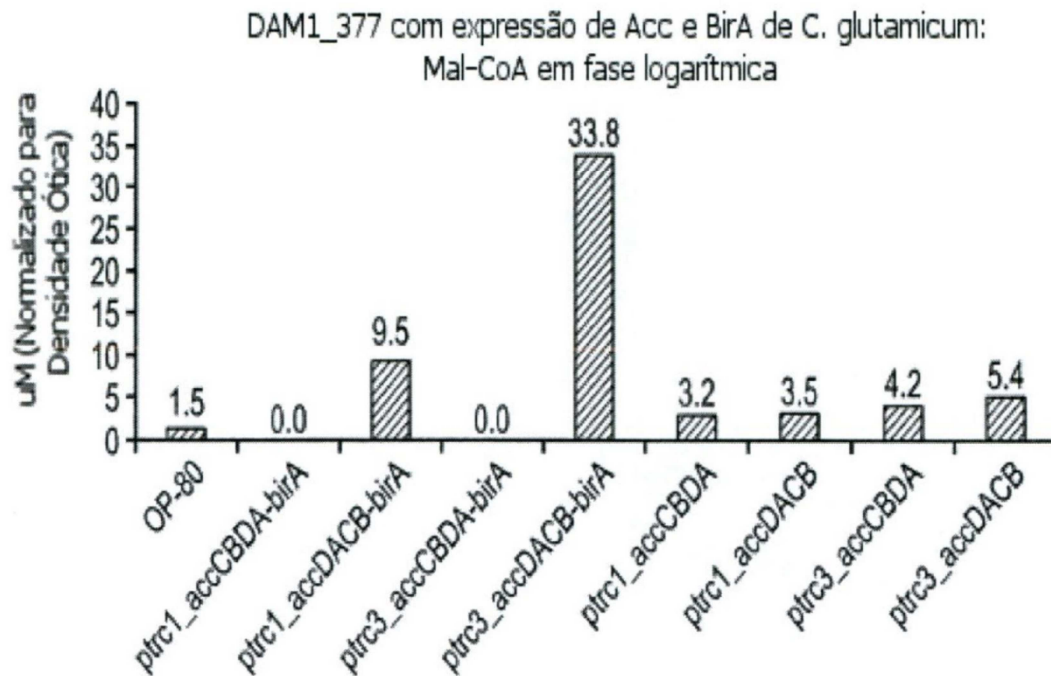


FIGURA 9

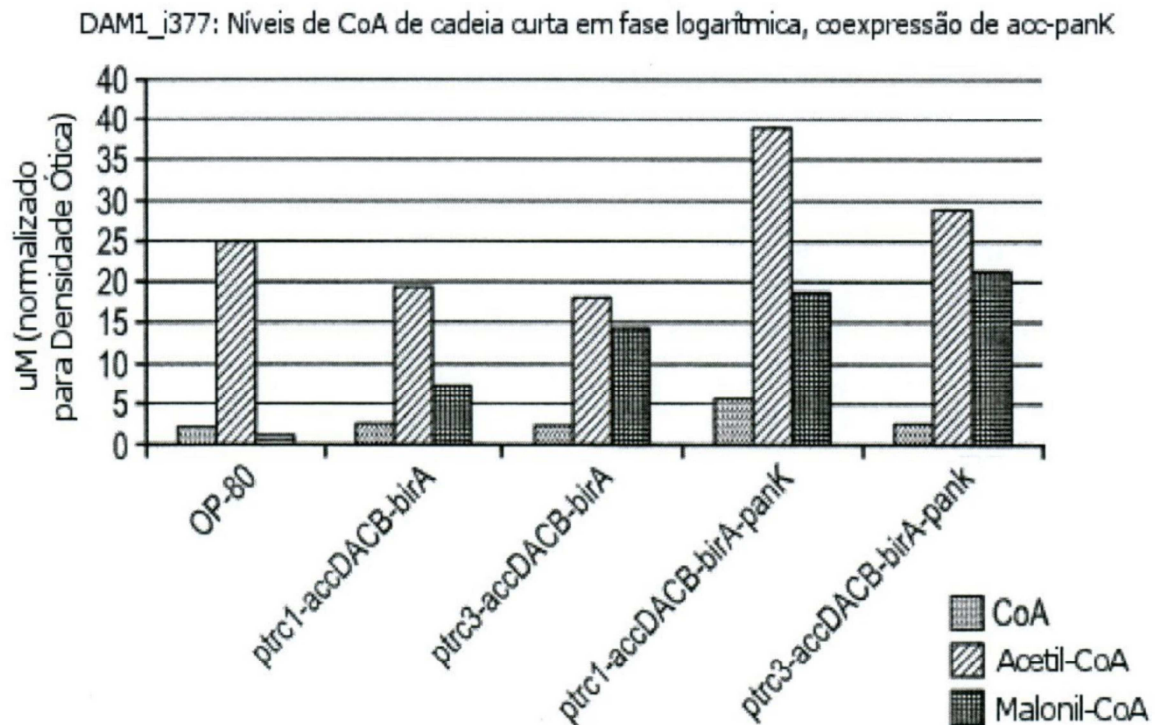


FIGURA 10

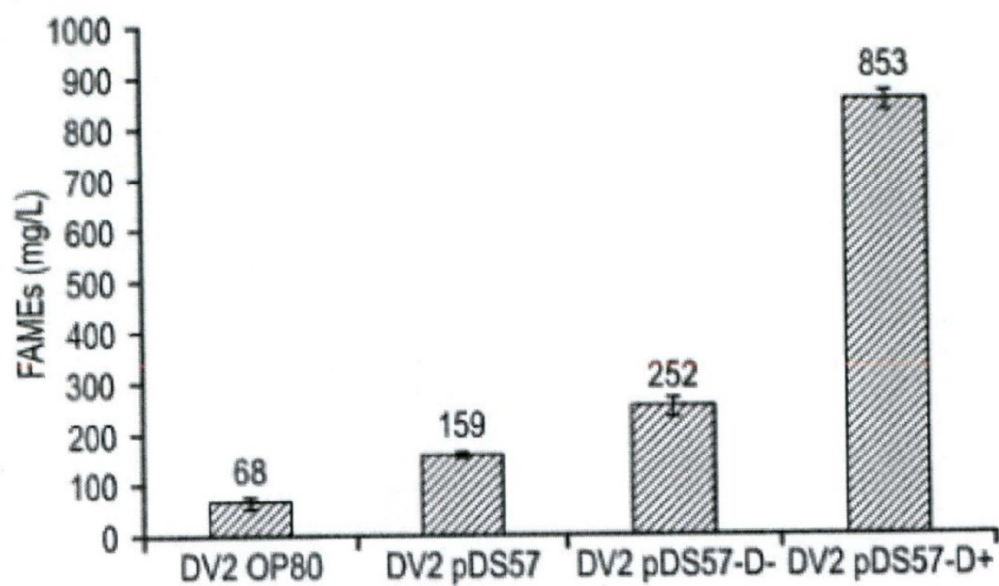


FIGURA 11

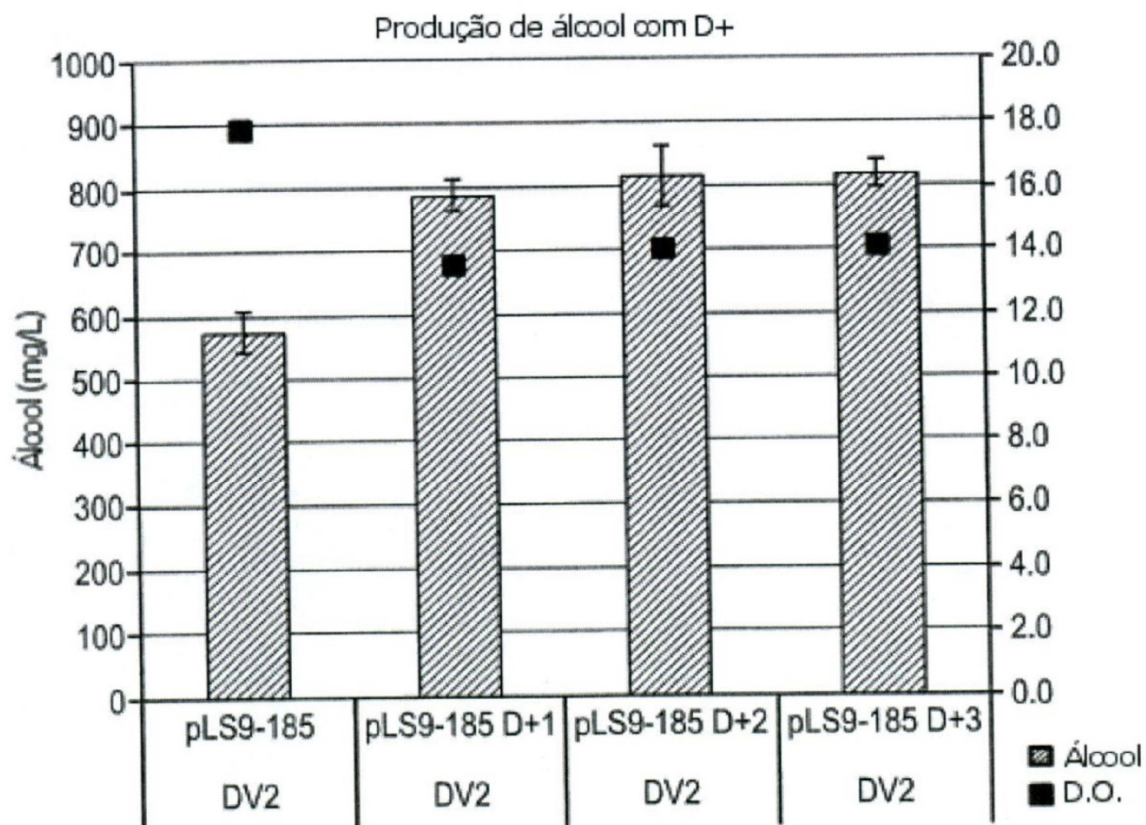


FIGURA 12A

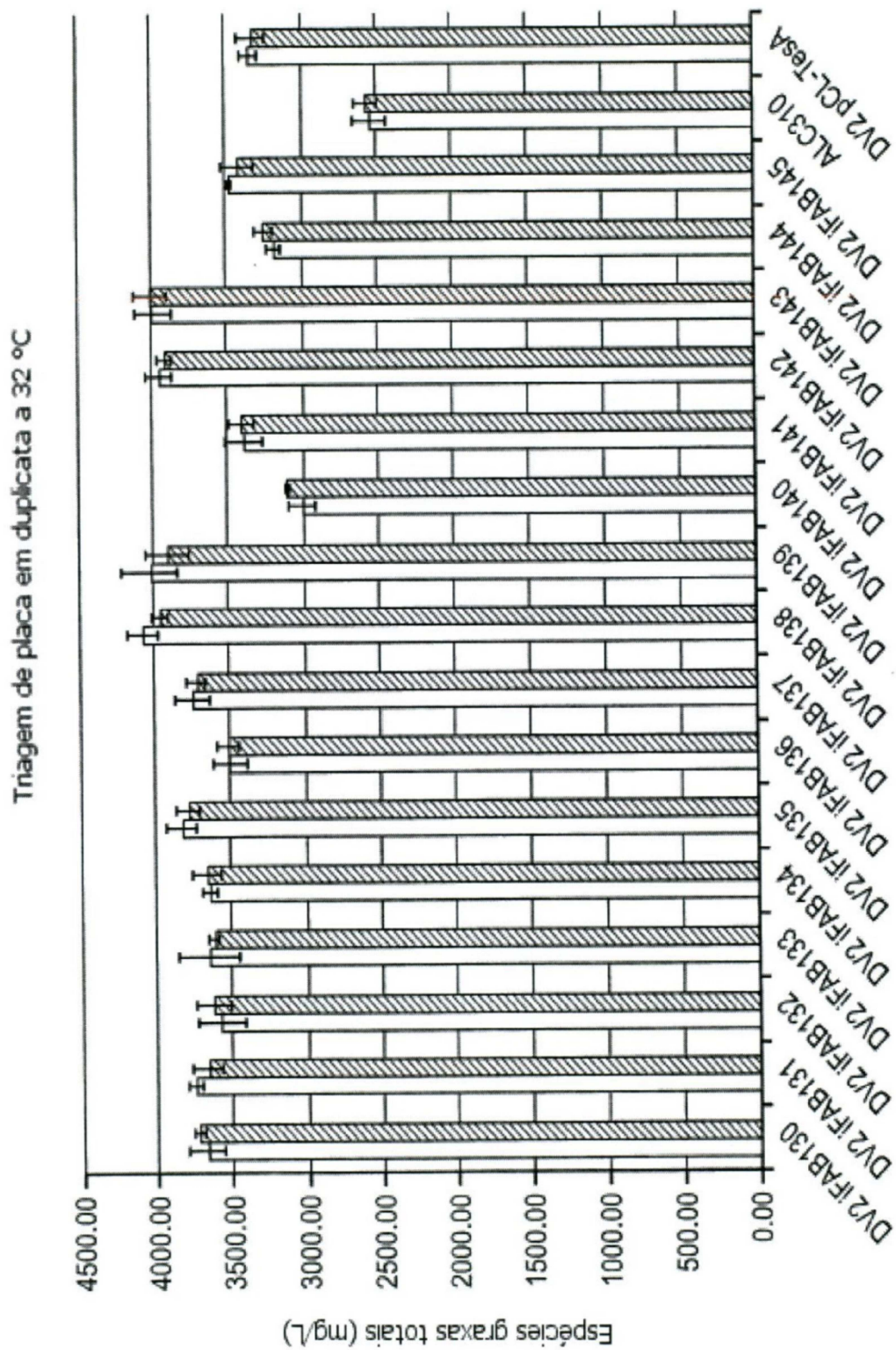


FIGURA 12B

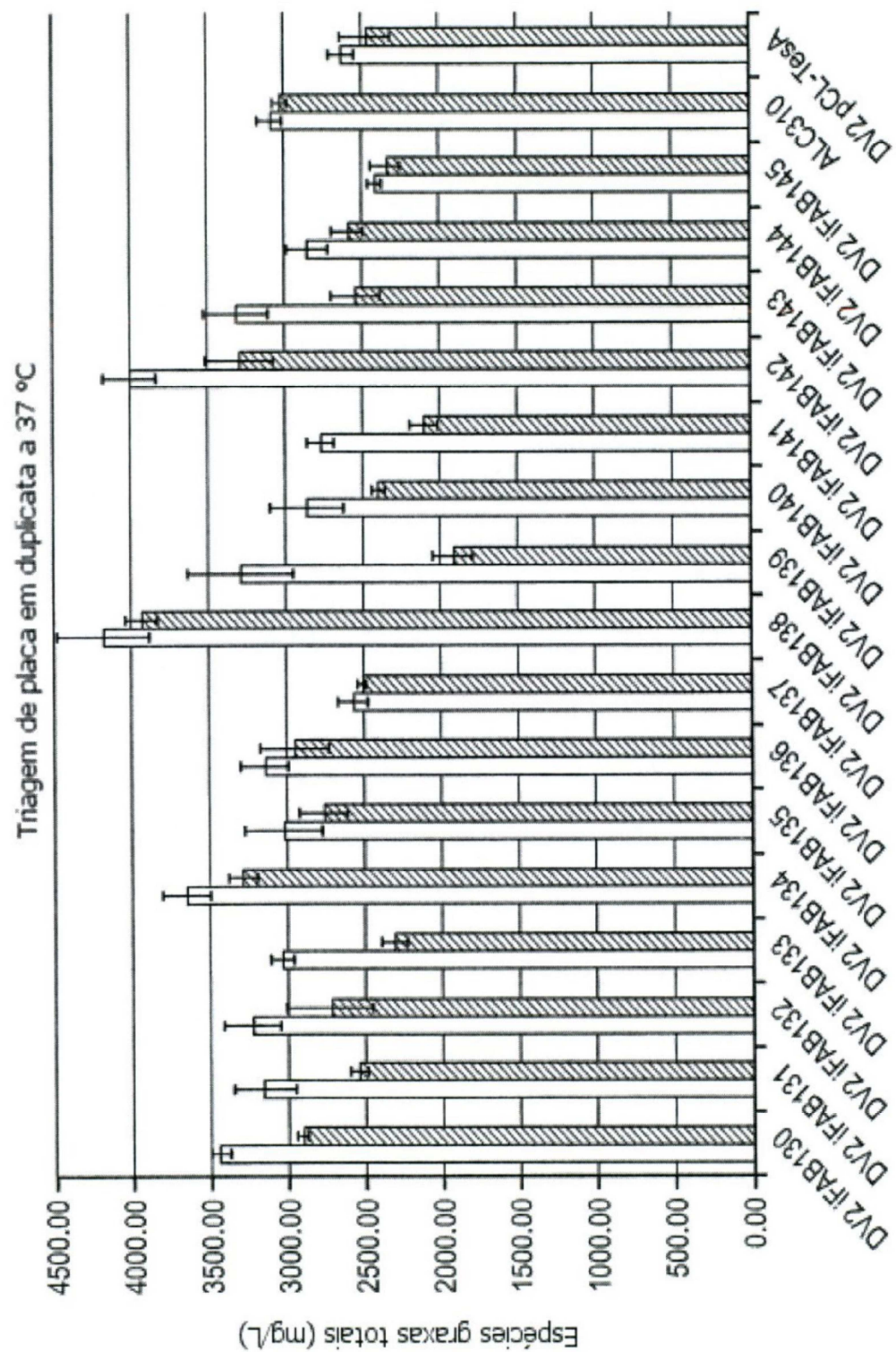


FIGURA 13

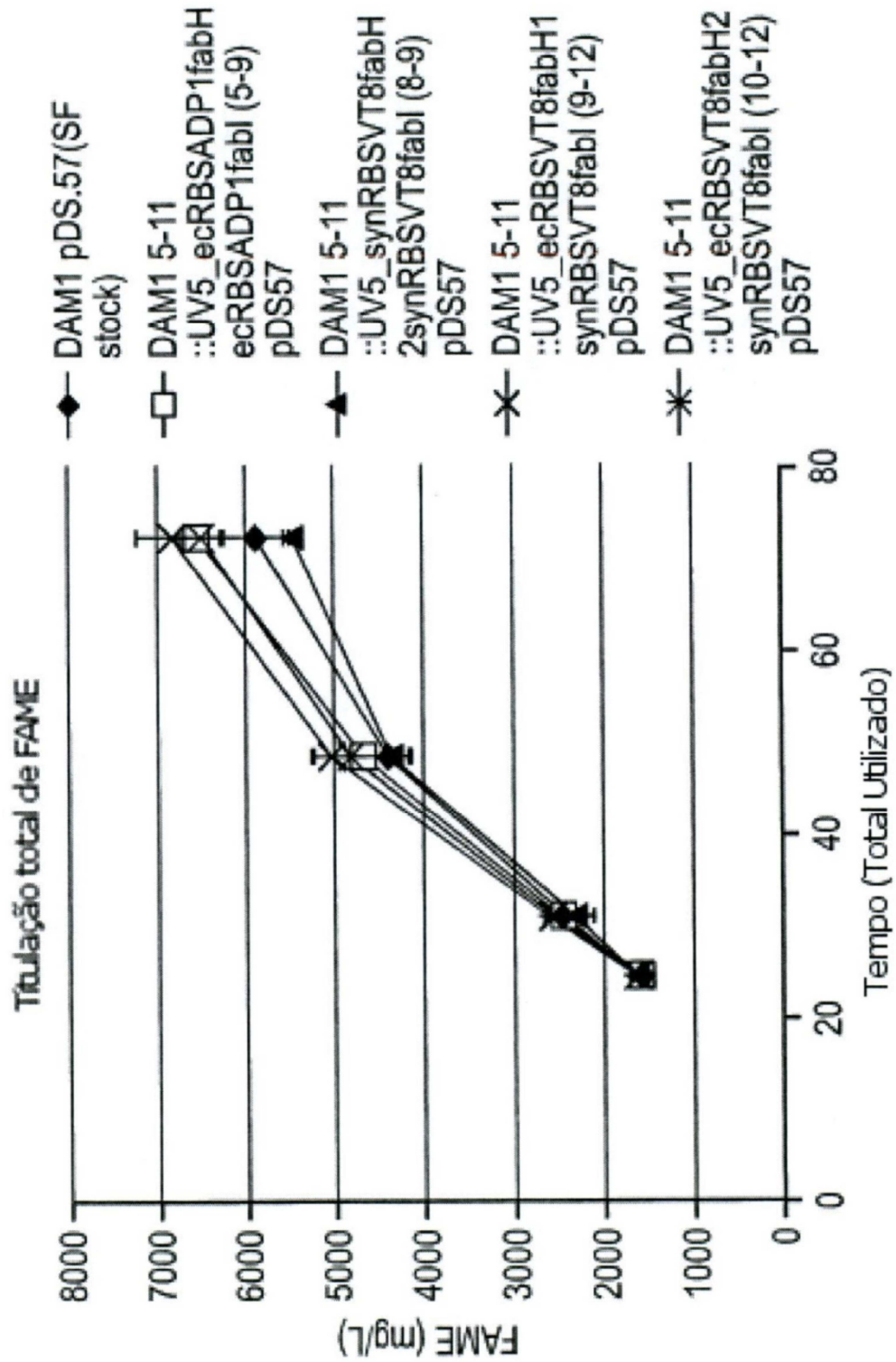


FIGURA 14

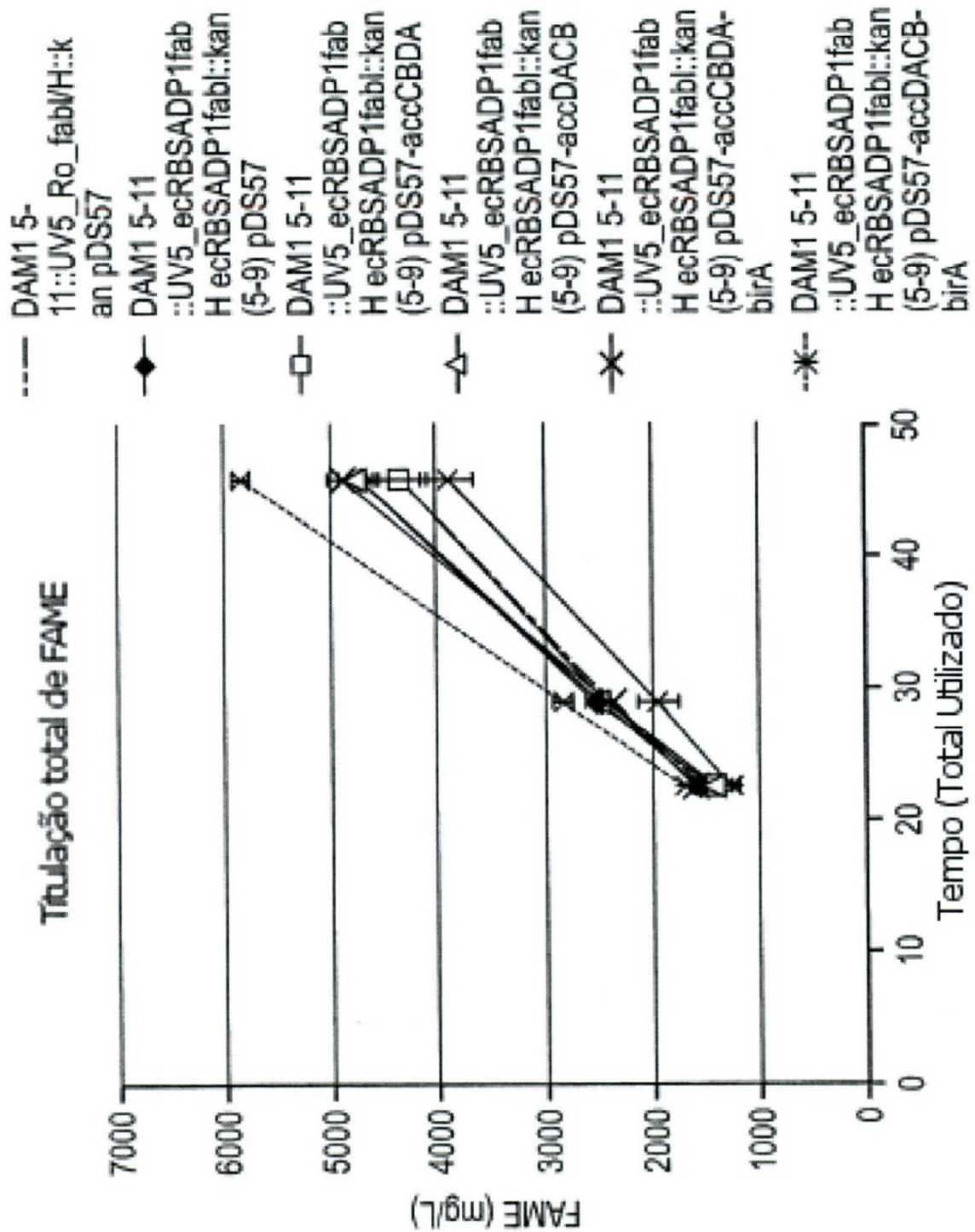


FIGURA 15

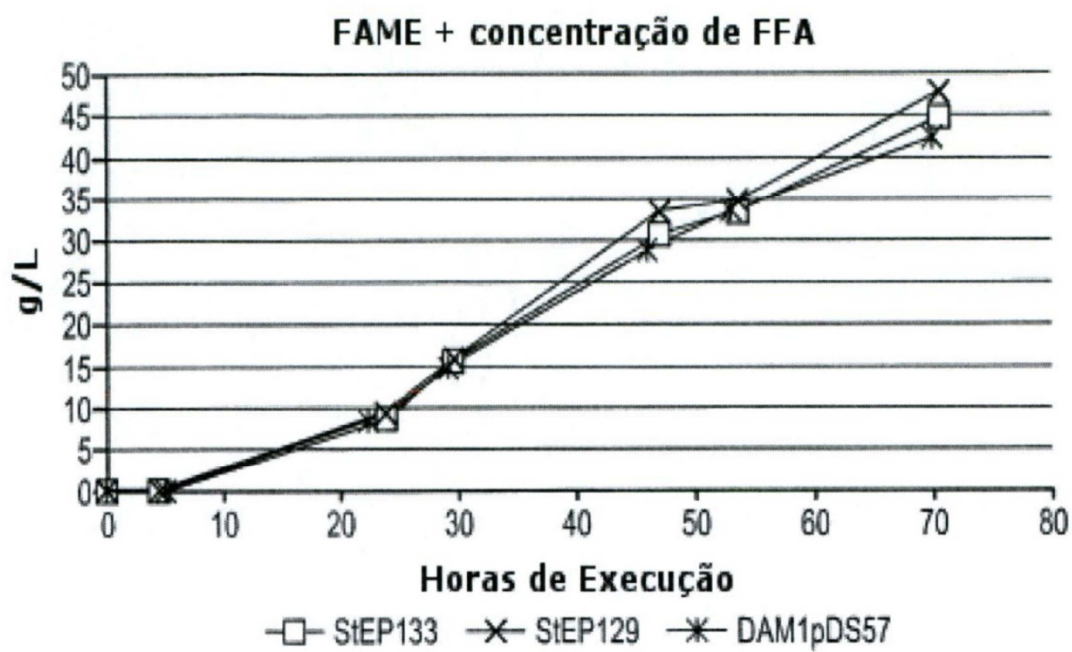


FIGURA 16A

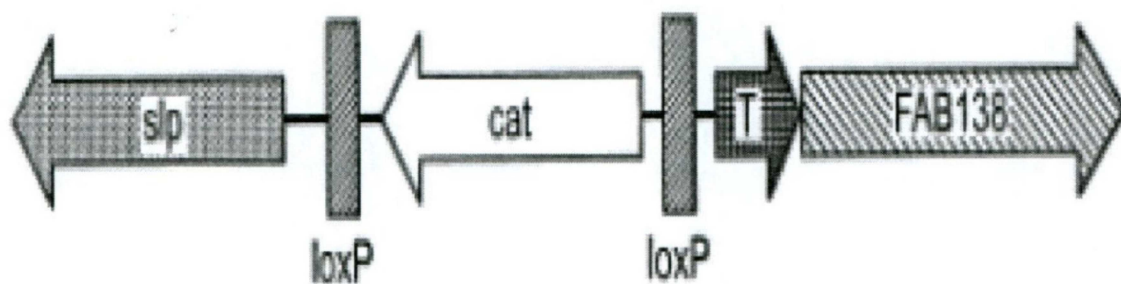


FIGURA 16B

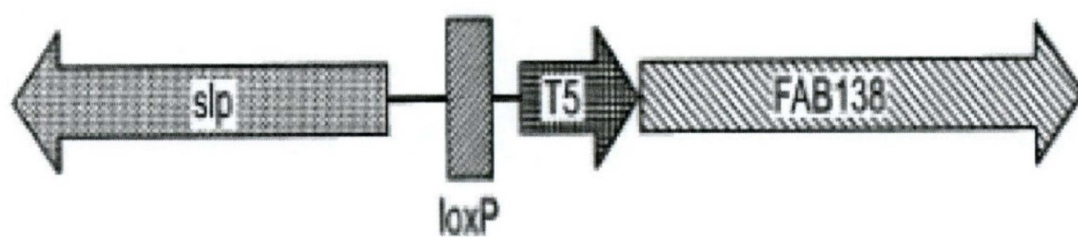


FIGURA 17

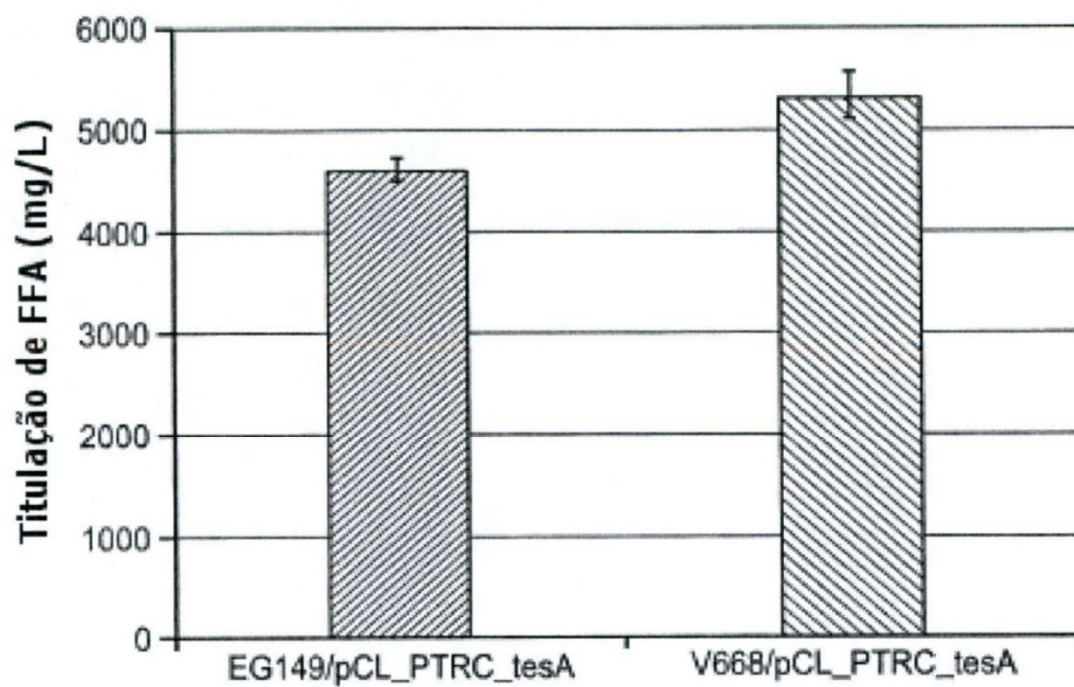


FIGURA 18

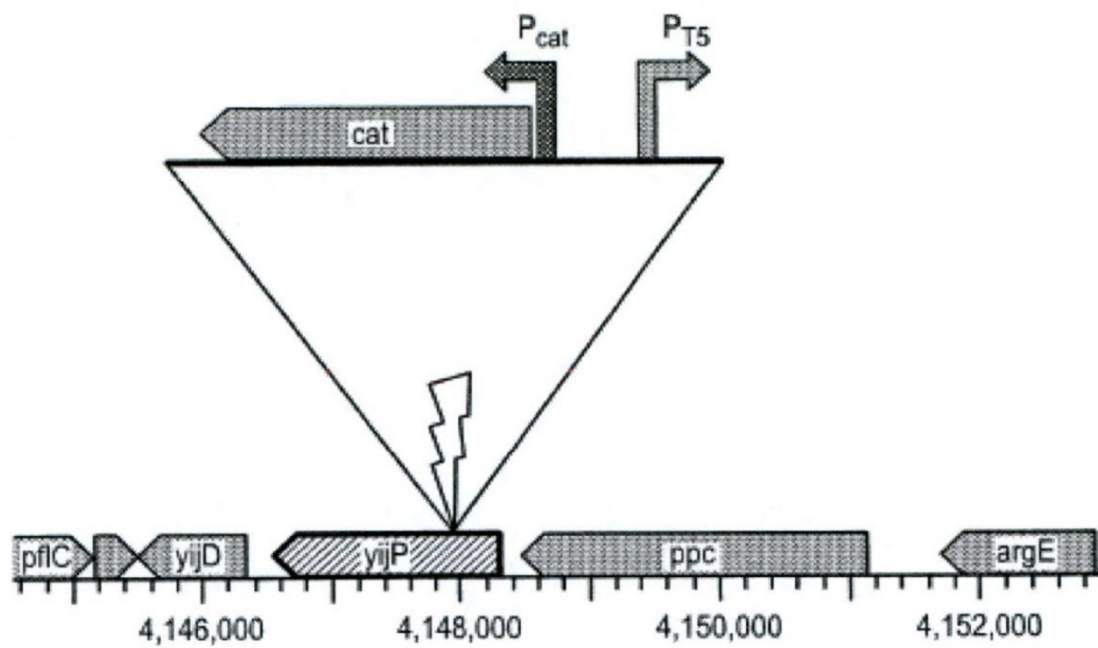


FIGURA 19

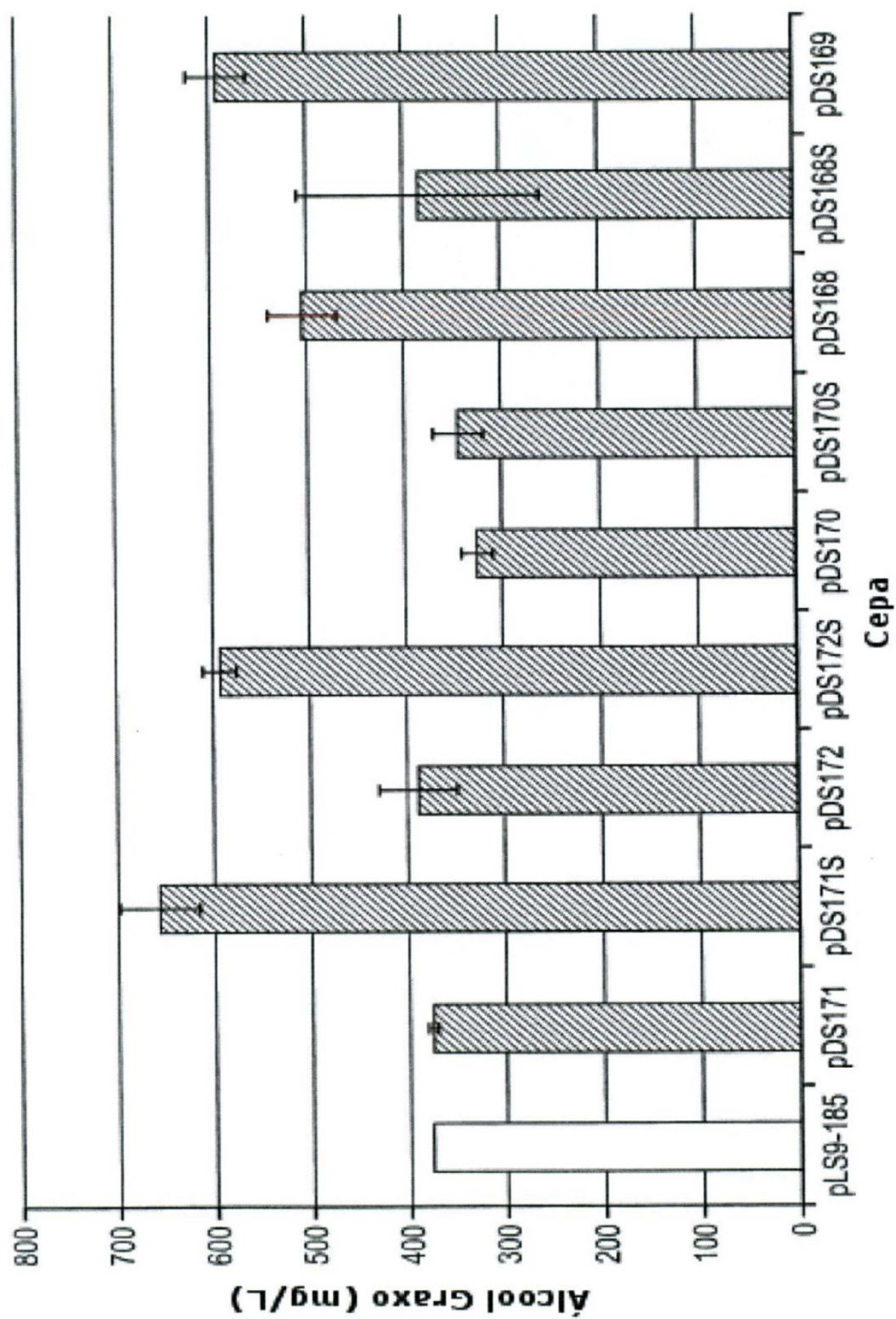


FIGURA 20

