



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

(11) PI 0906241-6 B1



(22) Data do Depósito: 25/03/2009

(45) Data de Concessão: 29/01/2019

(54) Título: MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO, GENE QUIMÉRICO, VETOR E MÉTODO DE TRANSFORMAÇÃO DE UMA CÉLULA BACTERIANA

(51) Int.Cl.: C12N 15/09.

(30) Prioridade Unionista: 27/03/2008 US 61/039,871.

(73) Titular(es): E.I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY; ALLIANCE FOR SUSTAINABLE ENERGY, LLC.

(72) Inventor(es): PAUL VIITANEN; CAROL MCCUTCHEN; LAURA MCCOLE; LUAN TAO; MARY ANN FRANDEN; MIN ZHANG; PERRY G. CAIMI; YAT-CHEN CHOU; YUYING ZHANG.

(86) Pedido PCT: PCT US2009038158 de 25/03/2009

(87) Publicação PCT: WO 2009/120730 de 01/10/2009

(85) Data do Início da Fase Nacional: 24/09/2010

(57) Resumo: MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEÍCO ISOLADA, GENE QUIMÉRICO, VETOR MÉTODO DE TRANSFORMAÇÃO DE UMA CÉLULA BACTERIANA Trata-se da identificação de mutantes do p romotor do gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase *Z. mobilis*, que aprimoram diretamente níveis de expressão de ácidos nucleicos heterólogos operavelmente ligados. Esses são. promotores de alta expressão úteis para a expressão de genes quiméricos em *Zymomonas*, *Zymobacter* e em outras bactérias relacionadas.

**“MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO, GENE QUIMÉRICO, VETOR E
MÉTODO DE TRANSFORMAÇÃO DE UMA CÉLULA BACTERIANA”**

REFERÊNCIA CRUZADA AO PEDIDO RELACIONADO

[001] O presente pedido reivindica o benefício do Pedido de Patente Provisório US 61/039871, depositado no dia 27 de Março de 2008, o qual é incorporado ao presente documento a título de referência.

DECLARAÇÃO DE DIREITOS GOVERNAMENTAIS

[002] A presente invenção foi realizada com o apoio do governo dos Estados Unidos da América sob os Números de Contrato 04-03-CA-70224 e DE-FC36-03GO13146 outorgados pelo Departamento de Energia. O governo dos Estados Unidos da América detém certos direitos sobre a presente invenção. Adicionalmente, o governo dos Estados Unidos da América detém direitos sobre a presente invenção sob o Número de Contrato DE-AC36-99GO10337 entre o Departamento Americano de Energia e o Laboratório Nacional de Energia Renovável, uma Divisão do Instituto de Pesquisa do Meio-Oeste.

CAMPO DA INVENÇÃO

[003] A presente invenção refere-se aos campos de microbiologia e engenharia genética. Mais especificamente, foram identificados novos promotores para expressão direta de genes quiméricos em bactéria.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[004] A produção de etanol por meio de microorganismos fornece uma fonte de energia alternativa a combustíveis fósseis e é, deste modo, uma área importante da pesquisa atual. É desejável que os microorganismos que produzem etanol, bem como outros produtos úteis, sejam capazes de usar xilose como uma fonte de carbono, já que a xilose é a maior pentose em materiais lignocelulósicos hidrolisados e, portanto, pode fornecer um substrato de carbono de baixo custo e disponível de modo abundante. O *Zymomonas*

mobilis e outros etalogênicos bacterianos, os quais não utilizam naturalmente xilose, podem ser geneticamente modificados para utilização de xilose por meio da introdução de genes que codificam 1) xilose isomerase, a qual catalisa a conversão de xilose para xilulose; 2) xiluloquinase, a qual fosforila xilulose para formar xilulose 5-fosfato; 3) transcetolase; e 4) transaldolase.

[005] Houve sucesso na modificação de cepas de *Z. mobilis* para o metabolismo da xilose (US 5514583, US 5712133, US 6566107, WO 95/28476, Feldmann *et al.* (1992) Appl Microbiol Biotechnol 38: 354 a 361, Zhang *et al.* (1995) Science 267:240 a 243), bem como uma cepa *Zymobacter palmae* (Yanase *et al.* (2007) Appl. Environ. Microbiol. 73:2592 a 2599). Entretanto, tipicamente, as cepas modificadas não crescem e produzem etanol tão bem em xilose como em glicose. Para essa modificação, os genes que codificam as proteínas heterólogas para metabolismo da xilose foram expressos a partir dos promotores ativos em células de *Z. mobilis*, tipicamente o promotor do gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Z. mobilis* ou o promotor do gene enolase de *Z. mobilis*.

[006] As cepas modificadas para utilização de xilose foram adaptadas através da passagem em série em meio de xilose, o que resulta em cepas com utilização de xilose aprimorada, conforme descrito no Pedido de Patente U.S. 7.223.575 e Pedido publicado de patente co-pendente e de propriedade comum US20080286870. No entanto, a base genética para o aprimoramento não havia sido determinada.

[007] Mantém-se uma necessidade por cepas geneticamente modificadas de *Zymomonas*, e outros etanolagênios bacterianos, dotados de utilização de xilose aprimorada. As Depositantes revelaram promotores mutantes dotados de atividade aumentada que podem ser usadas para expressar genes de utilização de xilose, na qual a atividade confere a cepas modificadas que compreendem estes promotores de utilização de xilos

aprimorada. Os promotores podem ser usados para expressão de outros genes.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

[008] A presente invenção refere-se a promotores mutantes isolados para expressão de genes, isto é, genes quiméricos em *Zymomonas*, *Zymobacter*, e bactérias relacionadas que direcionam níveis mais elevados de expressão de gene que níveis direcionados pelo promotor natural do gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Z. mobilis* (*Pgap*). Os promotores mutantes são derivados do promotor de gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Z. mobilis* e têm atividade aumentada devido à presença de mutações específicas. Os promotores podem ser usados na engenharia genética para expressão de uma região de codificação ou um RNA regulatório. A expressão de uma região de codificação para xilose isomerase direcionada por estes promotores resultaram no crescimento aprimorado de *Zymomonas mobilis* que utilizam xilose em meio que contém xilose.

[009] É descrita na presente invenção uma molécula isolada de ácido nucleico que compreende um promotor de gene de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Z. mobilis* que tem uma substituição nucleotídica em uma posição selecionada a partir do grupo que consiste na posição -190, posição -89, ou ambas as posições -190 e -89; em que os números de posição são relacionados com códon de iniciação (*start codon*) de tradução ATG natural para gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase nas cepas CP4 e ZM4 de *Z. mobilis*.

São também descritos no presente documento: um gene quimérico que compreende a molécula isolada de ácido nucleico descrita acima e operacionalmente ligada a uma molécula heteróloga de ácido nucleico; um vetor que compreende a molécula de ácido nucleico descrita acima e um método para modificar geneticamente uma célula bacteriana que compreende introduzir a molécula de ácido nucleico descrita acima na célula.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS E DESCRIÇÕES DE SEQUÊNCIAS

[010] As várias modalidades da presente invenção podem ser mais bem compreendidas a partir da descrição detalhada seguinte, das figuras e das descrições de sequências em anexo, que fazem parte deste presente pedido.

[011] A Figura 1 mostra as estratégias para ensaios enzimáticos de transcetolase (A), transaldolase (B), xilose isomerase (C), e xiluloquinase (D).

[012] A Figura 2 mostra um gráfico de atividades de xilose isomerase (XI) e xiluloquinase (XK) nas linhas T2C, T3C, T4C, e T5C transformadas com *PgapxylAB*.

[013] A Figura 3 mostra um gráfico de atividades de transaldolase (TAL) e transcetolase (TKT) nas linhas T2C, T3C, T4C, e T5C transformadas com *PgapxylAB*.

[014] A Figura 4 mostra um gráfico do rendimento teórico de etanol em % e da utilização de xilose em % das colônias adaptadas de cepas que utilizam xilose.

[015] A Figura 5 mostra um gráfico do crescimento de cepas adaptadas que utilizam xilose por 70 horas em RM (meio rico) com 5% de xilose (RMX5%) antes e depois do crescimento de 50 gerações em RM com 5% de glicose (RMG).

[016] A Figura 6 mostra mapas de plasmídeo de (A) pZB188; (B) pZB188/aadA; e (C) pZB188/aadA-GapXylA; bem como (D) uma representação esquemática do cassete de expressão de xilose isomerase de *E. coli* *PgapXylA*.

[017] A Figura 7 mostra mapas de plasmídeo de (A) pMODTM-2-*<MCS>*; (B) pMOD-ligante; e (C) pMOD-ligante-Spec.

[018] A Figura 8 mostra um mapa de plasmídeo de pLDHSp-9WW.

[019] A Figura 9 mostra um mapa de plasmídeo de pMOD-ligante-Spec-801GapXylA.

[020] A Figura 10 mostra mapas de plasmídeo de (A) pMOD-ligante-Spec-801GapXylA; (B) pZB188/aadA-GapXylA; e (C) pZB188/aadA-801GapXylA.

[021] A Figura 11 mostra um gráfico de curvas de crescimento (OD600 versus tempo) em meio que contém xilose para as três cepas que abrigaram o plasmídeo de expressão de xilose isomerase *Pgap* de *E. coli* (X1, X2 e X2) e as três cepas que abrigaram o plasmídeo de controle (C1, C2 e C3).

[022] A Figura 12 mostra gráficos de curvas de crescimento (OD600 versus tempo) das cepas ZW641, ZW658, X1 e C1 em meio que contém xilose sem espectinomicina plotada em (A) em uma escala linear, e em (B) em uma escala logarítmica.

[023] A Figura 13 mostra gráficos de curvas de crescimento (OD600 versus tempo) das três cepas com 801*Pgap*-XylA integrado (nº 8 a 2, nº 8 a 4, nº 8 a 5) e das três cepas com 641*Pgap*-XylA integrado (nº 6 a 1, nº 6 a 3, nº 6 a 5) comparado à cepa ZW658, plotada em (A) em uma escala linear, e em (B) em uma escala logarítmica.

[024] A Figura 14 mostra um mapa de plasmídeo de pZB188aadA/Gap/Zymo RPI/EcoliSL.

[025] A Figura 15 mostra mapas de plasmídeo de (A) pZB188aadA/Gap/Zymo RPI/EcoliSL; (B) pZB188aadA-641GapRPI; e (C) pZB188aadA-801GapRPI.

[026] A Figura 16 mostra um gel de proteínas coradas de todas as proteínas celulares das cepas com promotores que expressam RPI diferentes.

[027] A presente invenção pode ser mais completamente compreendida a partir da descrição detalhada seguinte e das descrições de

sequências em anexo, que fazem parte deste presente pedido.

[028] As sequências seguintes estão em conformidade com 37 C.F.R. 1.821 a 1.825 (“Requirements for Patent Applications Containing Nucleotide Sequences e/ou Amino Acid Sequence Disclosures - the Sequence Rules”) e são consistentes com o padrão ST.25 da Organização Mundial da Propriedade Intelectual (WIPO) (1998) e os requerimentos de listagem de sequência do EPO e PCT (Regras 5.2 e 49.5(a-bis), e Seção 208 e Anexo C das Instruções Administrativas). Os símbolos e formatos usados para dados de sequência de aminoácido e ácidos nucleicos atendem as regras estabelecidas em 37 C.F.R. §1.822.

[029] A SEQ ID Nº: 1 é a sequência de nucleotídeo do *ZmPgap* proveniente da cepa CP4 de *Z. mobilis*.

[030] A SEQ ID Nº: 2 é a sequência de nucleotídeo do *ZmPgap* proveniente da cepa ZM4 de *Z. mobilis*.

[031] A SEQ ID Nº: 3 é a sequência de nucleotídeo do *ZmPgap* proveniente da cepa pZB4, que também está no operon *PgapxylAB* das cepas ZW641 e 8XL4.

[032] A SEQ ID Nº: 4 é a sequência de nucleotídeo do *Pgap* aprimorado proveniente da cepa ZW658.

[033] A SEQ ID Nº: 5 é a sequência de nucleotídeo do *Pgap* aprimorado proveniente da cepa 8b.

[034] A SEQ ID Nº: 6 é a sequência de nucleotídeo de um *Pgap* aprimorado tanto com mutações -190 (ZW658) quanto com -89 (8b) na variante de pZB4 de *Pgap*.

[035] A SEQ ID Nº: 7 é a sequência de nucleotídeo de um *Pgap* aprimorado com a mutação -190 a partir de ZW658 na variante de CP4 de *Pgap*.

[036] A SEQ ID Nº: 8 é a sequência de nucleotídeo de um *Pgap*

aprimorado com a mutação -89 proveniente de 8b na variante de CP4 de *Pgap*.

[037] A SEQ ID Nº: 9 é a sequência de nucleotídeo de um *Pgap* aprimorado tanto com a mutação -190 (ZW658) quanto com -89 (8b) na variante de CP4 de *Pgap*.

[038] A SEQ ID Nº: 10 é a sequência de nucleotídeo de um *Pgap* aprimorado com a mutação -190 proveniente de ZW658 na variante de ZM4 de *Pgap*.

[039] A SEQ ID Nº: 11 é a sequência de nucleotídeo de um *Pgap* aprimorado com a mutação -89 proveniente de 8b na variante de ZM4 de *Pgap*.

[040] A SEQ ID Nº: 12 é a sequência de nucleotídeo de um *Pgap* aprimorado tanto com a mutação -190 (ZW658) como -89 (8b) na variante de ZM4 de *Pgap*.

[041] As SEQ ID Nºs: 13 e 14 são sequências de nucleotídeos de *primers* para amplificação de um fragmento de DNA que contém o promotor de gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*Pgap*) proveniente de pZB4.

[042] As SEQ ID Nºs: 15 e 16 são sequências de nucleotídeos de *primers* para amplificação de um fragmento de DNA que contém uma região de codificação *tal* proveniente de pZB4.

[043] As SEQ ID Nºs: 17 e 18 são sequências de nucleotídeos de *primers* para amplificação de um fragmento de DNA que contém *Pgaptal* proveniente dos fragmentos de *Pgap* e *tal*.

[044] As SEQ ID Nºs: 19 e 20 são sequências de nucleotídeos de *primers* para amplificação de um fragmento de DNA que contém *loxP:Cm* proveniente de pZB186.

[045] A SEQ ID Nº: 21 é a sequência de nucleotídeo completa para o plasmídeo pMODP*gaptal*tkiCm.

[046] As SEQ ID Nºs: 22 e 23 são sequências de nucleotídeos de

primers para amplificação de um fragmento de DNA de 3 kb que contém regiões de codificação *tal* e *tkl* em transformantes que recebem pMODP*gaptalkl*Cm.

[047] A SEQ ID N^o:24 é a sequência de nucleotídeo completa para o plasmídeo pMODP*gapxylABC*Cm.

[048] As SEQ ID N^{os}: 25 e 26 são sequências de nucleotídeos de *primers* para amplificação de um fragmento de DNA de 1.6 kb proveniente dos integrantes T2C, T3C, T4C e T5C com pMODP*gapxylABC*Cm.

[049] As SEQ ID N^{os}: 27 e 28 são sequências de nucleotídeos de *primers* para amplificação de um fragmento de DNA que contém o *Pgap* proveniente de ZW641 e ZW658.

[050] As SEQ ID N^{os}: 29 a 31 são sequências de nucleotídeos para *primers* para sequenciar o *Pgap* proveniente de ZW641 e ZW658.

[051] As SEQ ID N^{os}: 32 e 33 são sequências de nucleotídeos de *primers* para amplificação de um fragmento de DNA que contém a Spec^r-cassete.

[052] A SEQ ID N^o:34 é a sequência de nucleotídeo completa do cassete de expressão de xilose isomerase *PgapXylA*.

[053] As SEQ ID N^{os}: 35 e 36 são as sequências de nucleotídeo de oligonucleotídeos usados para substituir um sítio de clonagem múltipla diferente em pMOD2-<MCS>.

[054] As SEQ ID N^{os}: 37 e 38 são sequências de nucleotídeos de *primers* para amplificação das regiões *PgapxylA* provenientes das cepas ZW801-4 e ZW641 para inserção em pMOD-ligante-Spec para render plasmídeos pMOD-ligante-Spec-801GapXylA e pMOD-ligante-Spec-641GapXylA, respectivamente.

[055] As SEQ ID N^{os}: 39 e 40 são sequências de nucleotídeos de

primers para amplificação de um *Pgap* proveniente de pZB188/aadA-641GapXylA e que inclui os primeiros 15 pb da fase de leitura aberta (*Open Reading Frame (ORF)*) de RPI de *Z. mobilis*.

[056] As SEQ ID N^{os}: 41 e 42 são sequências de nucleotídeos de *primers* para amplificação da fase de leitura aberta de RPI de *Z. mobilis*.

[057] A SEQ ID N^o: 43 é a sequência de nucleotídeo completa do cassete de expressão de RPI que está no plasmídeo pZB188aadA/Gap/Zymo RPI/EcoliSL.

[058] As SEQ ID N^{os}: 44 e 45 são sequências de nucleotídeos de *primers* para amplificação de um fragmento de DNA que contém o *Pgap* proveniente de 8XL4 e 8b.

[059] A SEQ ID N^o: 46 é a sequência de nucleotídeo completa de um *primer* para sequenciar o *Pgap* proveniente de 8XL4 e 8b.

[060] A SEQ ID N^o: 47 é a sequência de nucleotídeo de uma parte de *ZmPgap* de CP4, ZM4 e pZB4 com SEQ ID N^{os}: 1, 2 e 3, respectivamente, contendo a posição -190.

[061] A SEQ ID N^o: 48 é a sequência de nucleotídeo de uma parte de *ZmPgap* de CP4, ZM4 e pZB4 com SEQ ID N^{os}: 1, 2 e 3, respectivamente, contendo a posição -89.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[062] Estão descritos no presente documento novos promotores que podem ser usados para expressão de genes quiméricos em células bacterianas. As Depositantes revelaram que cada uma das duas mutações diferentes do promotor de gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Z. mobilis* aumenta separadamente o nível de expressão direcionado pelo promotor. Uma mutação é na posição -190, e a segunda mutação é na posição -89, ambas em relação ao códon de iniciação (*start codon*) de tradução ATG natural para gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase nas cepas CP4 e ZM4 de *Z.*

mobilis. Um promotor de gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Z. mobilis* que contém apenas um, ou ambas as mutações, pode ser usado para expressão de sequências de DNA heteróloga ligadas operacionalmente em células bacterianas.

[063] As definições e abreviações a seguir serão usadas para interpretação do relatório descritivo e das reivindicações.

[064] Conforme usado no presente documento, os termos “compreende”, “que compreende”, “inclui”, “que inclui”, “tem”, “que tem”, “contém” ou “que contém,” ou qualquer variação dos mesmos, são destinados a abranger uma inclusão não-exclusiva. Por exemplo, uma composição, uma mistura, processo, método, artigo ou aparelho que compreende uma lista de elementos não é necessariamente limitado a somente aqueles elementos, porém, pode incluir outros elementos não expressamente listados ou inerentes a tal composição, mistura, processo, método, artigo ou aparelho. Além disso, ao menos que seja expressamente indicado o contrário, “ou” se refere a um ou inclusivo e não a um ou exclusivo. Por exemplo, uma condição A ou B é satisfeita por qualquer um dos seguintes: A é verdadeiro (ou presente) e B é falso (ou não presente), A é falso (ou não presente) e B é verdadeiro (ou presente), e tanto A quanto B são verdadeiros (ou presentes).

[065] Ademais, os artigos indefinidos “um” e “uma” que precedem um elemento ou componente da presente invenção são destinados a serem não restritivos em relação ao número de instâncias (isto é, ocorrências) do elemento ou componente. Portanto, “um” ou “uma” deve ser lido de modo a incluir um ou pelo menos um, e a forma singular da palavra do elemento ou componente também inclui o plural, a menos que o número se refira evidentemente à forma singular.

[066] “Gene” se refere a um fragmento de ácido nucleico que expressa uma proteína específica ou uma molécula de RNA funcional, as quais

podem incluir sequências reguladoras que precedem (5' sequências de não-codificação) e sucedem (3' sequências de não-codificação) a sequência de codificação. "Gene nativo" ou "gene do tipo selvagem" se refere a um gene encontrado na natureza com suas próprias sequências reguladoras. "Gene quimérico" se refere a qualquer gene que não é um gene nativo, que compreende sequências reguladoras e de codificação que não são encontradas juntas na natureza. Consequentemente, um gene quimérico pode compreender sequências reguladoras e sequências de codificação que são derivadas de diferentes fontes, ou sequências reguladoras e sequências de codificação derivadas da mesma fonte, porém, dispostas de uma maneira diferente daquela encontrada na natureza. "Gene endógeno" se refere a um gene nativo em seu local natural no genoma de um organismo. Um gene "estranho" se refere a um gene não encontrado normalmente no organismo anfitrião, porém, que é introduzido no organismo anfitrião através de transferência de gene. Os genes estranhos podem compreender genes nativos inseridos em um organismo não-nativo, ou genes quiméricos

[067] O termo "construção genética" refere a um fragmento de ácido nucleico que codifica a expressão de uma ou mais proteínas específicas ou moléculas de RNA funcionais. Na construção genética, o gene pode ser nativo, quimérico ou estranho em natureza. Tipicamente, uma construção genética irá compreender uma "sequência de codificação". Uma "sequência de codificação" se refere a uma sequência de DNA que codifica uma sequência de aminoácido específica.

[068] "Promotor" ou "Regiões de controle de iniciação" se referem a uma sequência de DNA capaz de controlar a expressão de uma sequência de codificação ou RNA funcional. Em geral, uma sequência de codificação é localizada a 3' de uma sequência promotora. Os promotores podem ser derivados em sua integridade a partir de um gene nativo, ou podem

ser compostos a partir de diferentes elementos derivados de diferentes promotores encontrados na natureza, ou pode até mesmo compreender segmentos de DNA sintéticos. Os técnicos no assunto irão compreender que diferentes promotores podem direcionar a expressão de um gene em tecidos ou tipos de célula distintos, ou em diferentes estágios de desenvolvimento, ou em resposta a diferentes condições ambientais. Os promotores que fazem com que um gene seja expresso na maioria dos tipos de células na maioria das vezes são comumente denominados "promotores constitutivos".

[069] O termo "expressão", conforme usado na presente invenção, se refere à transcrição e à acumulação estável de codificação (mRNA) ou RNA funcional derivada a partir de um gene. A expressão também pode se referir à tradução de mRNA para um polipeptídeo. "Inibição antisense" se refere à produção de transcrições de RNA antisense capaz de suprimir a expressão da proteína alvo. "Superexpressão" se refere à produção de um produto de gene em organismos transgênicos que excede os níveis de produção em organismos normais ou não-transformados. A "co-supressão" se refere à produção de transcrições de RNA senso ou fragmentos capazes de suprimir a expressão de genes endógenos ou estranhos idênticos ou substancialmente similares (U.S. 5.231.020).

[070] O termo "RNA mensageiro (mRNA)", conforme usado na presente invenção, se refere ao RNA que se encontra sem íntrons e que podem ser traduzido para proteína através da célula.

[071] O termo "transformação", conforme usado na presente invenção, se refere to à transferência de um fragmento de ácido nucleico para um organismo anfitrião, resultando em herança geneticamente estável. O ácido nucleico transferido pode estar na forma de um plasmídeo mantido na célula anfitriã, ou algum ácido nucleico transferido pode ser integrado ao genoma da célula anfitriã. Os organismos hospedeiros que contêm os fragmentos de ácido

nucleico transformados são denominados organismos "transgênicos" ou "recombinantes" ou "transformados".

[072] Os termos "plasmídeo" e "vetor", conforme usado na presente invenção, se referem a um elemento cromossômico extra que transporta, com frequência, genes que não fazem parte do metabolismo central da célula, e que estão usualmente na forma de moléculas de DNA de filamento duplo circular. Tais elementos podem ser independentemente sequências de replicação, sequências de integração no genoma, fago ou sequências de nucleotídeo, lineares ou circulares, de um DNA ou RNA de filamento único ou duplo, derivado de qualquer fonte, nos quais diversas sequências de nucleotídeo foram unidas ou recombinadas em uma construção única que é capaz de introduzir um fragmento promotor e uma sequência de DNA para um produto de gene selecionado junto com a sequência não-traduzida 3' adequada em uma célula.

[073] O termo "operacionalmente ligado" se refere à associação de sequências de ácido nucleico em um único fragmento de ácido nucleico para que a função de uma seja afetada pelo outra. Por exemplo, um promotor é operacionalmente ligado a uma sequência de codificação quando é capaz de afetar a expressão daquela sequência de codificação (isto é, a sequência de codificação fica sob o controle transcricional do promotor). As sequências de codificação podem ser operacionalmente ligadas às sequências reguladoras em orientação senso ou antisenso.

[074] O termo "marcador selecionável" se refere a um fator de identificação, usualmente um gene de resistência antibiótico ou químico, que é capaz de ser selecionado com base no efeito de um gene marcador, isto é, resistência a um antibiótico, em que o efeito é usado para rastrear a herança de um ácido nucleico de interesse e/ou para identificar uma célula ou organismo que herdou o ácido nucleico de interesse.

[075] O termo “heterólogo” significa que não é naturalmente encontrado no meio de interesse. Por exemplo, um gene heterólogo se refere a um gene que não é naturalmente encontrado no organismo hospedeiro, porém é introduzido no organismo hospedeiro através de transferência de gene. Por exemplo, uma molécula heteróloga de ácido nucleico presente em um gene quimérico é uma molécula de ácido nucleico que não é naturalmente encontrada associada aos outros segmentos do gene quimérico, como as moléculas de ácido nucleico que têm a região de codificação e os segmentos de promotores que não são naturalmente associados um ao outro.

[076] Conforme usado no presente documento, uma “molécula isolada de ácido nucleico” é um polímero de RNA ou DNA de filamento único ou duplo, que contém opcionalmente bases de nucleotídeo alterada, não-natural ou sintética. Uma molécula isolada de ácido nucleico da forma de um polímero de DNA pode ser composta de um ou mais segmentos de cDNA, DNA genômico ou DNA sintético.

[077] Os termos “promotor de gene de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Z. mobilis*” e “*ZmPgap*” se referem a uma molécula de ácido nucleico com atividade promotora que tem uma base sequência que ocorre naturalmente *upstream* da região de codificação de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase no genoma de *Z. mobilis*.

[078] Esses termos se referem aos promotores de cepas de *Z. mobilis*, como as cepas CP4 e ZM4 (SEQ ID N^{os}:1 e 2, respectivamente), e a variantes em sequência e/ou comprimento que direcionam a expressão a um nível que não é substancialmente diferente, como o *ZmPgap* de pZB4 (SEQ ID N^o:3).

[079] O DNA recombinante padrão e as técnicas de clonagem molecular usadas aqui são conhecidas no estado da técnica e são descritas por Sambrook, J., Fritsch, E. F. e Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory*

Manual, 2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, Nova York, 1989 (doravante “Maniatis”); e por Silhavy, T. J., Bannan, M. L. e Enquist, L. W. *Experiments with Gene Fusions*; Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, Nova York, 1984; e por Ausubel, F. M. *et al.*, In *Current Protocols in Molecular Biology*, publicado por Greene Publishing e Wiley-Interscience, 1987.

REVELAÇÃO DE PROMOTORES DO GENE GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO

DESIDROGENASE APRIMORADOS

[080] Um promotor natural do gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Z. mobilis* (*ZmPgap* ou *Pgap*) foi usado para expressão de genes quiméricos em *Zymomonas mobilis* e *Zymobacter palmae*. Quando um *ZmPgap* foi usado para expressar genes para metabolismo de xilose, a utilização de xilose resultante tipicamente não é tão eficaz quanto desejado. Uma cepa de *Z. mobilis* recombinante modificada para expressar quatro enzimas de metabolismo de xilose (xilose isomerase, xiluloquinase, transcetolase e transaldolase) com xilose limitada com a utilização da capacidade foi adicionalmente adaptada em de xilose para utilização de xilose aprimorada (descrita na Pedido de patente publicado co-pendente e de propriedade comum US20080286870).

[081] As Depositantes revelaram, conforme descrito no Exemplo 3 no presente documento, que a cepa aprimorada que utiliza xilose denominada ZW658 (ATCC nº PTA-7858) tem expressão aumentada das enzimas de xilose isomerase e xiluloquinase que foram integradas ao genoma como um operon expresso proveniente de *ZmPgap* (operon *PgapxylAB*). As Depositantes adicionalmente relataram que há uma única mudança no novo nucleotídeo no promotor do operon *PgapxylAB* que é responsável pela expressão aumentada que direciona o promotor das regiões de codificação operacionalmente ligadas. A mudança de nucleotídeo é nova em relação à

sequência do *Pgap* do operon *PgapxylAB* na cepa ZW658 quando comparada à sequência do *ZmPgap* do operon *PgapxylAB* em uma cepa precursora a ZW658 que não têm atividades aumentadas de xilose isomerase e xiluloquinase. Assim, o *Pgap* que tem esta única mudança de nucleotídeo é um promotor aprimorado.

[082] As Depositantes revelaram, em adição, que uma cepa de *Z. mobilis* que foi separadamente modificada com os genes que codificam as quatro enzimas de utilização de xilose e separadamente adaptadas para utilização de xilose aprimorada (cepa 8b, descrita no pedido de patente U.S. 7.223.575) também aumentou a expressão das enzimas de xilose isomerase e xiluloquinase que foram integradas ao genoma como um operon *PgapxylAB*. As Depositantes revelaram adicionalmente que há uma única mudança no novo nucleotídeo no *Pgap* do operon *PgapxylAB* na cepa 8b que se encontra em uma posição diferente que a mudança do ZW658 *Pgap*. Com sabe na expressão aumentada das enzimas de xilose isomerase e xiluloquinase codificadas pelo operon *PgapxylAB*, o *Pgap* mutante do operon *PgapxylAB* também fornece um promotor aprimorado.

[083] As mudanças identificadas de novos nucleotídeos no *Pgap* do ZW658 e operons *PgapxylAB* da cepa 8b se encontram nas posições -190 e -89, respectivamente, em relação ao códon de iniciação de tradução ATG natural para gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase nas cepas CP4 e ZM4 de *Z. mobilis*. A mudança de nucleotídeo relatada na posição -190 é a partir de G a T, e na posição -89 é a partir de C a T.

[084] Os contextos de sequências das mudanças de base são fatores importantes, já que o número da posição pode mudar devido às variações de sequências.

[085] A posição -190 se encontra no contexto de sequência: AACGGTATACTGGAATAAATGGTCTTCGTTATGGTATTGATGTTTTT(SEQ ID

Nº: 47) que é uma parte de *ZmPgap* de CP4, ZM4 e pZB4 com SEQ ID N^{os}: 1, 2 e 3, respectivamente, onde o G sublinhado e em negrito é a base que sofreu mudanças para T pela mutação. Esta posição é -190 na sequência *ZmPgap* das cepas CP4 e ZM4, mas a posição -189 em pZB4 desde que na sequência promotora em pZB4 há uma deleção de T na posição -21.

[086] A posição -89 se encontra no contexto de sequência: CGGCATCACGAAC**A**AGGTGTTGGCCGCGATCGCCGGTAAGTCGGC (SEQ ID Nº: 48) que é uma parte de *ZmPgap* de CP4, ZM4 e pZB4 com SEQ ID N^{os}: 1, 2 e 3, respectivamente, onde o C sublinhado e em negrito é a base que sofreu mudanças para T pela mutação.

[087] Esta posição é -89 na sequência *ZmPgap* das cepas CP4 e ZM4, mas a posição -88 em pZB4 desde que na sequência do promotor em pZB4 há uma deleção de T na posição -21. Os promotores da presente invenção têm uma mudança de nucleotídeo em *ZmPgap* na posição -190, na posição -89, ou em ambas as posições. De preferência, as mudanças se tratam de uma mudança de G para T na posição -190 e uma mutação de C para T na posição -89. Os presentes promotores que compreendem estas modificações são *Pgaps* aprimorados.

[088] As mudanças para outros nucleotídeos para as posições -190 e -89 podem fornecer atividade aprimorada de *ZmPgap*. Em adição, as mudanças de nucleotídeo em outras posições em *ZmPgap* podem fornecer atividade aprimorada de promotores.

[089] A sequência de ocorrência natural de *ZmPgap* não é uma sequência única, mas pode ter alguma variação na sequência que não tem nenhum efeito substancial na função promotora. Ter nenhum efeito substancial na função promotora significa que a sequência promotora direciona a um nível de expressão substancialmente similar ao nível de expressão direcionado por um *ZmPgap* presente em uma cepa de *Zymomonas mobilis* natural. A variação

na sequência pode ocorrer entre cepas ou isolados diferentes de *Zymomonas mobilis*, como a diferença entre as cepas CP4 e ZM4 na posição -29 em relação ao códon de iniciação de tradução ATG natural para gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (SEQ ID Nº: 1 e 2, respectivamente), onde em CP4 há um A e em ZM4 há um G.

[090] Em adição à variação de sequência de ocorrência natural, as mudanças de nucleotídeo que não afetam a função pode ocorrer durante procedimento de manipulação de rotina, que inclui, clonagem, transformação e crescimento de cepa, como é de conhecimento de um técnico no assunto. Um exemplo é o *ZmPgap* de pZB4, que tem uma deleção de T na posição -21.

[091] Qualquer mudança de nucleotídeo na sequência *ZmPgap*, que ocorre em cepas naturais ou modificadas, que não afetam substancialmente a função promotora, pode estar presente na sequência de um promotor de gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Z. mobilis* como a deleção de um T após a posição -21 que se encontra no *ZmPgap* de pZB4 (SEQ ID Nº: 3). Deste modo, as mutações nas posições -190 e -89 descritas acima não afetam a função promotora, isto é, que substancialmente aprimoram a função promotora, podem ser produzidas em qualquer sequências *ZmPgap* com atividade substancialmente similar (nível natural) e podem co-ocorrer com variações que não afetam a função.

[092] Os exemplos de sequências *Pgap* aprimoradas com as mutações descritas nas posições -189 e/ou -88 incluem a sequência promotora proveniente da cepa ZW658 (SEQ ID Nº: 4), proveniente da cepa 8b (SEQ ID Nº: 5), e uma mutação dupla da mesma variante *ZmPgap* que é proveniente de pZB4 (SEQ ID Nº: 6). Os exemplos adicionais de sequências *Pgap* aprimoradas são -190, -89, ou mutação dupla na variante *ZmPgap* proveniente de CP4 (SEQ ID Nº: 7, 8 e 9, respectivamente) e -190, -89, ou mutação dupla na variante *ZmPgap* proveniente de ZM4 (SEQ ID Nº: 10, 11 e 12,

respectivamente).

[093] Em adição, as variações no comprimento do *ZmPgap* ocorrem de modo a não afetarem substancialmente a função promotora. A presente invenção inclui *Pgaps* aprimorados que têm as mutações descritas na posição -190 e/ou -89 em relação ao códon de iniciação de tradução ATG natural para gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase nas cepas CP4 e ZM4 de *Z. mobilis* em *ZmPgaps* de comprimento variado que não têm mudança substancial na atividade antes da adição das mutações -190 e/ou -89.

PREPARAÇÃO DE UM PGAP APRIMORADO

[094] As mutações descritas nas posições -190 e/ou -89 podem ser introduzidas em uma molécula de ácido nucleico do *ZmPgap* por qualquer método conhecido pelo técnico no assunto. Por exemplo, um oligonucleotídeo que tem a mutação e a sequência de DNA circundante pode ser sintetizado e clonado em um fragmento de DNA promotor maior, substituído pelo segmento sem a mutação. Os *primers* que contêm a mutação e alguma sequência do promotor adjacente podem ser sintetizados e utilizados na PCR para preparar o fragmento promotor. Um fragmento de DNA promotor inteiro pode ser sintetizado como múltiplos oligonucleotídeos que são ligados juntos. A mutagênese sítio-dirigida pode ser utilizada para introduzir a mutação(s). Além disso, os promotores mutantes podem ser preparados como fragmentos de DNA amplificados por PCR com a utilização de DNA da cepa ZW658 ou 8b como modelo.

PGAP APRIMORADO EM GENES QUIMÉRICOS E VETORES, INTRODUÇÃO EM CÉLULAS

BACTERIANAS

[095] Um promotor da presente invenção pode estar operacionalmente ligado a uma molécula nucleica heteróloga que está para ser expressa em uma célula bacteriana, formando uma molécula de ácido nucleico quimérica, ou gene quimérico da presente invenção. O desenho e construção

de genes quiméricos são de conhecimento de um técnico no assunto. Um gene quimérico inclui, tipicamente, um promotor, uma molécula heteróloga de ácido nucleico a ser expressa, e uma região de controle de terminação 3'. As regiões de controle de terminação podem ser derivadas a partir de vários genes, e são tomadas frequentemente a partir de genes nativos a uma célula-alvo hospedeira. A molécula heteróloga de ácido nucleico operacionalmente ligada pode ser qualquer molécula de ácido nucleico da qual a expressão é desejada em uma célula bacteriana, incluindo, por exemplo, uma região de codificação para uma proteína ou peptídeo, ou um ácido nucleico para expressão de um RNA funcional. Os RNAs funcionais incluem, por exemplo, RNAs antisense, ribozimas e RNAs interferentes. Em adição, um operon pode ser construído que compreende o promotor descrito no presente documento e regiões de codificação múltiplas expressas a partir do promotor.

[096] Os promotores descritos no presente documento podem ser usados em genes quiméricos para expressão em bactéria que pertence a *Zymomonas* ou *Zymobacter*.

[097] Os genes quiméricos podem ser usados para expressão de qualquer proteína envolvida na produção de um produto de *Zymomonas* ou *Zymobacter*. Por exemplo, uma ou mais enzimas envolvidas na síntese de um aminoácido, como alanina ou de sorbitol ou xilitol, podem ser expressas a partir de um gene quimérico dotadas destes promotores. Os genes quiméricos podem ser expressos em uma cepa *Zymomonas* ou *Zymobacter* natural que não utiliza xilose, ou em uma cepa que utiliza xilose. Além disso, os promotores descritos no presente documento podem ser usados para expressão de enzimas relacionadas ao metabolismo de xilose ou outra trajetória metabólica.

[098] Os genes quiméricos descritos no presente documento são tipicamente construídos em ou transferidos a um vetor para manipulações

adicionais. Os vetores são de conhecimento de um técnico no assunto. Certos vetores são capazes de se replicar a uma ampla faixa da bactéria hospedeira e podem ser transferidos através de conjugação. A sequência completa e registrada de pRK404 e três vetores relacionados: pRK437, pRK442 e pRK442(H) estão disponíveis. Estes derivados provaram serem ferramentas valiosas para manipulação genética em bactéria gram-negativa (Scott *et al.*, *Plasmid* 50(1):74 a 79 (2003)).

[099] Outros vetores conhecidos podem ser usados em células-alvo hospedeiras diferentes. Exemplos de vetores úteis para hospedeiros diferentes são descritos no Pedido de Patente publicado co-pendente e de propriedade comum US20070092957 A1, PP 11 a 13, incorporado ao presente documento a título de referência. Os vetores, que são particularmente úteis para expressão, que podem se replicar tanto em *E. coli* como em *Zymomonas*, como pZB188 que está descrito em US 5.514.583. Os vetores podem incluir plasmídeos pra replicação autônoma em uma célula, e plasmídeos para transportar construções a serem integradas aos genomas bacterianos. Os plasmídeos para integração de DNA podem incluir transposons, regiões de sequência homóloga de ácido nucleico ao genoma-alvo bacteriano, ou outras sequências que suportam integração. Um tipo adicional de vetor pode ser um transposomo produzido com o uso de, for exemplo, um sistema comercialmente disponível junto à EPICENTRE®. É de conhecimento como selecionar um vetor apropriado a um hospedeiro-alvo desejado e uma função desejada.

[0100] Um promotor descrito no presente documento também pode ser construído em um vetor sem uma molécula de ácido nucleico operacionalmente ligada para expressão, e adjacente integrado a uma região de codificação endógena para substituir um promotor endógeno em um genoma bacteriano ou para adicionar um promotor, for exemplo a uma região

de codificação sem um operon. As substituições de promotor cromossômico podem ser efetuadas com o uso de métodos, conforme descrito por Yuan *et al* (Metab. Eng. (2006) 8:79 a 90), e White *et al*. (Can. J. Microbiol. (2007) 53:56 a 62).

[0101] Os vetores que compreendem um promotor descrito no presente documento podem ser introduzidos em uma célula bacteriana através métodos conhecidos, como o uso de transformação por degelo, transformação mediada por cálcio, eletroporação ou conjugação.

EXPRESSÃO DE MOLÉCULA HETERÓLOGA DE ÁCIDOS NUCLEICOS UTILIZANDO P_{GAP}

APRIMORADO

[0102] Os níveis aumentados de expressão de gene quimérico podem ser obtidos com o uso de *P_{gap}* aprimorado descrito no presente documento. Um gene quimérico construído com um *P_{gap}* aprimorado e uma região de codificação de xilose isomerase que foi integrada ao genoma são mostrados no presente documento no Exemplo 8 de modo a permitir crescimento aprimorado em meio de xilose de células de *Z. mobilis* modificadas para expressar genes que codificam proteínas para metabolismo de xilose. O crescimento aprimorado em xilose é mostrado no presente documento nos Exemplos 3 e 10 relacionados à expressão de níveis mais elevados de atividade de xilose isomerase e atividades de xiluloquinase. As cepas que utilizam xilose de *Z. mobilis* adaptadas para melhor crescimento em xilose e que têm um *P_{gap}* aprimorado que direciona a expressão de xilose isomerase e xiluloquinase aprimoraram a utilização de xilose. As atividades de xilose isomerase e xiluloquinase foram cerca de 4 a 5 vezes mais elevadas que em cepas sem um *P_{gap}* aprimorado que direcionam expressão de xilose isomerase e xiluloquinase.

[0103] O nível aumentado de expressão de um gene quimérico que contém um *P_{gap}* aprimorado da presente invenção e colocado em um

plasmídeo estável também é mostrado no Exemplo 9 do presente documento. Um gene quimérico que tem um *Pgap* aprimorado operacionalmente ligado a uma sequência heteróloga que codifica ribose 5-fosfato isomerase (RPI) produzida em uma quantidade mais elevada de proteína RPI quando comparado à quantidade produzida proveniente de um gene quimérico que contém um *ZmPgap*.

EXEMPLOS

[0104] Os Exemplos ilustram as invenções descritas no presente documento.

MÉTODOS GERAIS

[0105] As técnicas de clonagem molecular e DNA recombinante padrão são conhecidas no estado da técnica e são descritas por Sambrook, J., Fritsch, E. F. e Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY (1989) (doravante "Maniatis"); e por Silhavy, T. J., Bennan, M. L. e Enquist, L. W., *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY (1984); e por Ausubel, F. M. *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, publicado por Greene Publishing Assoc. e Wiley-Interscience, Hoboken, NJ (1987).

[0106] O significado das abreviações é como segue: "kb" significa kilobase(s), "pb" significa pares de base, "nt" significa nucleotídeo(s), "hr" significa hora(s), "min" significa minuto(s), "sec" significa segundo(s), "d" significa dia(s), "L" significa litro(s), "ml" significa mililitro(s), "μL" significa microlitro(s), "μg" significa micrograma(s), "ng" significa nanograma(s), "mM" significa milimolar, "μM" significa micromolar, "nm" significa nanometro(s), "μmol" significa micromol(s), "pmol" significa picomol(s), "Cm" significa cloranfenicol, "Cmr" significa resistente à cloranfenicol, "Cms" significa sensível à cloranfenicol, "Spr" significa

resistência à espectinomicina, “Sps” significa sensível à espectinomicina, “XI” is xilose isomerase, “XK” é xiluloquinase, “TAL” é transaldolase, “TKT” é transcetolase, “EFT” significa tempo de fermentação decorrido, “RM” significa meio rico que contém 10 g/L de extrato de levedura mais 2 g/L de KH_2PO_4 , “MM” significa meio correspondente que contém 10 g/L de extrato de levedura, 5 g/L triptona, 2,5 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 0,2 g/L KH_2PO_4 .

PREPARAÇÃO DE EXTRATOS LIVRES DE CÉLULAS DE ZYMOMONAS PARA ENSAIO

ENZIMÁTICO

[0107] As células foram cultivadas em 50 ml de RM + 2% de glicose a 30° C de um dia para o outro a um OD_{600} de 1,0 a 1,2. As células foram colhidas por centrifugação de 4500 rpm por 10 min à 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* da célula foi submetido à lavagem com 25 ml de tampão de sonificação gelado (10 mM Tris, pH de 7,6, 10 mM MgCl_2), seguido por centrifugação a 4500 rpm por 10 min. O *pellet* foi resuspenso em 2,0 a 2,5 ml de tampão de sonificação mais 1 mM de ditioneitol. Uma alíquota de 500 µL foi centrifugada por 1 min em uma centrífuga de Eppendorf a 4° C. A maioria dos sobrenadantes foi descartada, deixando cerca de 10 a 20 µL para trás a fim de impedir que o *pellet* seque. As células foram congeladas e armazenadas a cerca de -80° C até o ensaio. Antes do ensaio, as células foram descongeladas e resuspensas com 500 µL de tampão de sonificação mais 1 mM ditioneitol. A mistura foi sonificada 2x por 45 segundos em um ciclo de trabalho a 62% e um controle de saída de 2 com o uso de um sonificador 450 da Branson, deixando amostras resfriadas cerca de 3 a 5 min entre as sonificações. As amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 60 min em uma microcentrífuga da Beckman à 4°C. O sobrenadante foi transferido para um tubo novo e mantido a 4°C. O ensaio Pierce (BCA) foi usado para determinar as concentrações de proteína.

[0108] O ensaio de transcetolase (TKT) foi usualmente

desempenhado já que esta enzima é mais lábil que as outras. Um diagrama do ensaio de TKT é mostrado na Figura 1A.

[0109] Em um ensaio em microplaca, 20 µL de extrato livre de célula foi adicionado em cada poço em uma mistura da reação, a 30° C, que inclui as seguintes concentrações finais dos componentes: 0,37 mM de NADP, 50 mM de TrisHCl de pH 7,5, 8,4 mM de Mg Cl₂, 0,1 mM de TPP (cloreto de tiamina fosfato), 0,6 mM de E4P (eritrose-4-fosfato), 4mM de BHP (betahidroxipiruvato), 4U/ml de PGI (fosfoglicose isomerase), e 4 U/ml de G6PD (glicose-6-fosfato desidrogenase). O A₃₄₀ foi lido em um leitor de placas por 3 a 5 min. A atividade de TKT foi calculada como segue:

1 unidade corresponde à formação de 1 µmol de D-frutose 6-fosfato / min a 30°C.

$$U (\mu\text{mole}/\text{min}) = \text{inclinação (dA}_{340}/\text{min}) * \text{volume da reação } (\mu\text{L}) / 6220 / 0,55 \text{ cm}$$

(moles de NADP→NADPH é 6220 A₃₄₀ por mol por L em uma cubeta de 1 cm)

(comprimento do trajeto de 200 µL por poço em microplaca=0,55 cm)

$$\text{Atividade Específica } (\mu\text{mol}/\text{min-mg}) = \mu\text{mole}/\text{min} / \text{concentração de proteína (mg)}$$

[0110] A base do ensaio de transaldolase (TAL) é mostrada na Figura 1B. Em um ensaio de microplaca, foi adicionado 20 µL de extrato livre de célula a cada poço em uma mistura de reação, a 30° C, que inclui as seguintes concentrações finais de componentes: 0,38 mM de NADH, 87 mM de trietanolamina, 17 mM de EDTA, 33 mM de F6P (frutose-6-fosfato), 1,2 mM de E4P (eritrose-4-fosfato), 2,0 U/ml de GDH (Glicerol-3-fosfato desidrogenase), e 20 U/ml de TPI (Triose fosfato isomerase). A placa foi incubada por 5 minutos, então o A₃₄₀ foi lido por 3 a 5 minutos. A atividade TAL foi calculada como

segue:

1 unidade corresponde à formação de 1 μmol de D-gliceraldeído por minuto à 30°C

$$U (\mu\text{mol}/\text{min}) = \text{inclinação (dA}_{340}/\text{min}) * \text{volume de reação } (\mu\text{L}) / 6220 / 0,55 \text{ cm}$$

(moles de $\text{NADH} \rightarrow \text{NAD}$ é 6220 A_{340} por mol por L em uma cubeta de 1 cm)

(comprimento do trajeto de 200 μL por poço em microplaca=0,55 cm)

Atividade Específica ($\mu\text{mole}/\text{min-mg}$) = $\mu\text{mol}/\text{min}$ / proteína

[0111] A base do ensaio de xilose isomerase (XI) é mostrada na Figura 1C. Em um ensaio de microplaca, 20 μL de extrato livre de célula foi adicionado a cada poço em uma mistura de reação, a 30°C, que inclui as seguintes concentrações finais de componentes: 0,256 mM de NADH, 50 mM de xilose, 10 mM de MgSO_4 , 10 mM de trietanolamina, e 1U/ml de SDH (sorbitol desidrogenase). O A_{340} foi lido em um leitor de placa por 3 a 5 minutos. A atividade XI foi calculada como segue:

1 unidade de XI corresponde à formação de 1 μmol de D-xilulose por minuto à 30°C

$$U (\mu\text{mol}/\text{min}) = \text{inclinação (dA}_{340}/\text{min}) * \text{volume de reação } (\mu\text{L}) / 6220 / 0,55 \text{ cm}$$

(moles de $\text{NADHP} \rightarrow \text{NAD}$ é 6220 A_{340} por mol por L em uma cubeta de 1 cm)

(comprimento do trajeto de 200 μL por poço em microplaca=0,55 cm)

Atividade Específica ($\mu\text{mol}/\text{min-mg}$) = $\mu\text{mol}/\text{min}$ / concentração de proteína (mg)

[0112] A base do ensaio de xiluloquinase (XK) é mostrada na

Figura 1D. Em um ensaio de microplaca, 20 µL de extrato livre de célula foi adicionado a cada poço em uma mistura de reação, a 30°C, que inclui as seguintes concentrações finais de componentes: 0,2 mM de NADH, 50 mM de Tris HCl de pH 7,5, 2,0 mM de MgCl₂·6H₂O, 2,0 mM de ATP 0,2 mM de PEP (fosfoenolpiruvato), 8,5 mM de D-xilulose, 5 U/ml de PK (piruvato quinase), e 5 U/ml de LDH (lactato desidrogenase). O A₃₄₀ foi lido em um leitor de placa por 3 a 5 min. A atividade XI foi calculada como segue:

1 unidade corresponde à formação de 1 µmol de D-xilulose para D-xilulose-5-fosfato por minuto à 30°C

$$U (\mu\text{mol}/\text{min}) = \text{inclinação (dA}_{340}/\text{min}) * \text{volume de reação } (\mu\text{L}) / 6220 / 0,55 \text{ cm}$$

(moles de NADH→NAD é 6220 A₃₄₀ por mol por L em uma cubeta de 1 cm)

(comprimento do trajeto de 200 µL por poço em microplaca= 0,55 cm)

$$\text{Atividade Específica } (\mu\text{mol}/\text{min-mg}) = \mu\text{mol}/\text{min} / \text{concentração de proteína (mg)}$$

MÉTODO HPLC

[0113] A análise foi feita com um HPLC da Agilent da série 1100 e um software Chem Station da Agilent para LC 3D. A coluna foi da BioRad Aminex HPX-87H (Coluna de Análise Orgânica HPLC 125-0140) com Cátion-H de Cartucho Micro-Guard da BioRad (125-0129). As condições de operação foram:

Fluxo 0,6 ml/min

Solvente 0,01N de H₂SO₄

Tempo de Parada 25 min

Volume de Injeção 5 µL

Amostrador automático Controle de Tempo @ 10º C ou 4º C

Temperatura da Coluna 55º C

Detetor Índice Refrativo (40º C) Com Curvas de
Calibração Padrões Externas

EXEMPLO 1

CONSTRUÇÃO DE CEPAS DE *ZYMOMONAS MOBILIS* QUE FERMENTAM XILOSE

[0114] Conforme descrito no pedido de patente publicado co-pendente e de propriedade comum US20080286870, as cepas de *Zymomonas mobilis* que fermentam xilose foram construídas através da integração de dois operons, PgapxylAB e Pgaptaltkt, que contêm quatro genes que utilizam xilose que codificam xilose isomerase, xiluloquinase, transaldolase e transcetolase, no genoma de ZW1 (ATCC #31821) através de eventos de transposição sequencial, seguido pela adaptação em meio seletivo que contém xilose. Anteriormente, uma Cepa de *Zymomonas mobilis* que fermentam xilose denominada 8b foi construída, conforme descrito no pedido de patente publicado U.S. 20030162271, através da integração de dois operons PgapxylAxyIB e Penotaltkt, juntamente com marcadores de antibiótico selecionável, no genoma de *Zymomonas mobilis* 5C através de uma combinação de recombinação homogênea e abordagens de transposon seguida pela adaptação e mutagênese NTG. Na preparação de novas cepas, foi usada transposição (sistema de transposição *in vitro* de Epicentre EZ::Tn), em oposição à recombinação homóloga específica de sítio, devido ao fato de que esta abordagem oferece as vantagens de escolhas múltiplas de sítios de integração e relativamente alta frequência de inserção. Os quatro genes que codificam as enzimas de utilização de xilose foram dispostos e clonados como dois operons separados: PgapxylAB e Pgaptaltkt para a integração. Um marcador resistente a antibiótico, um gene (Cm^r) resistente à cloranfenicol

flanqueado por duas sequências de reconhecimento para Cre-recombinase fago (loxP) P1, foi afixado a cada operon para a seleção de integrantes. A integração dos dois operons foi realizada em duas etapas, de uma maneira sequencial: Pgaptaltkt seguida por PgapxylAB. A seleção resistente à Cm foi usada em ambos os eventos de, desde que a mesma fosse removida ao expressar uma Cre recombinase em um plasmídeo seguida pela cura do plasmídeo após cada integração. Este processo permitiu o uso do mesmo marcador antibiótico para seleção diversas vezes. Mais importante, permitiu a remoção do marcador antibiótico introduzido para seleção da integração dos operons. Este processo eliminou o impacto negativo do(s) gene(s) resistente à antibiótico na cepa de fermentação para uso comercial.

CONSTRUÇÃO DE PMODPGAPTALTKTCM PARA TRANSPOSIÇÃO

[0115] Conforme descrito no pedido de patente publicado U.S. 20030162271 (Exemplo 9 do presente documento), um fragmento de DNA de 2.2 kb que contém a região de codificação de transcetolase (tkt) a partir de *E. coli* foi isolado a partir de pUCtaltkt (pedido de patente publicado U.S. 20030162271) por digestão por BglII/XbaI e clonado em um vetor pMOD (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI) digerido com BamHI/XbaI, resultando em pMODtkt. Um fragmento de PCR denominado Pgaptal foi gerado através da fusão da região promotora do gene de *Zymomonas mobilis* gap (Pgap; gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) com a região codificadora de *E. coli* transaldolase (tal) como segue. Um fragmento de Pgap foi amplificada a partir de pZB4, a construção do qual é descrita na patente U.S. 5514583 (Exemplo 3), com o uso de *primers* com SEQ ID Nº: 13 e 14. A pZB4 contém um operon de Pgap-xylA/xylB e um operon de Peno-tal/tkt. Um fragmento de região codificadora tal foi amplificado a partir de pZB4 com o uso de *primers* com SEQ ID Nº: 15 e 16. Um fragmento de Pgaptal foi amplificado com o uso de fragmentos de Pgap e tal como modelos com o uso de *primers* com SEQ ID

Nº:17 e 18. Este fragmento foi digerido com XbaI e clonado no plasmídeo pMODtkk, *upstream* da região codificadora tkt. Um fragmento de A loxP::Cm foi gerado por PCR com o uso de *primers* Cmlox(F,sfi) e Cmlox(R,sfi) (SEQ ID Nº:19 e 20) e pZB186 como o modelo. O pZB186 é uma combinação de um plasmídeo de *Z. mobilis* nativo e pACYC184, descrito em US514583 (Exemplo 3) e Zhang *et al.* ((1995) Science 267:240 a 243). Finalmente, o fragmento de PCR loxP::Cm foi inserido no sítio SfiI do Pgaptaltkt que contém plasmídeo para formar o pMODPgaptaltktCm de plasmídeo integrativo. Neste plasmídeo, o fragmento de Pgaptaltkt loxP::Cm foi inserido entre duas extremidades de mosaico (sítios de ligação de transposase) no vetor pMOD. A sequência de nucleotídeo completa para o plasmídeo de pMODPgaptaltktCm é determinada como SEQ ID Nº:21.

TRANSPOSIÇÃO E TRANSFORMAÇÃO DE PMODPGAPTALTKTCM EM ZW1

[0116] O pMOD de plasmídeo é um vetor com base de pUC, e, portanto, é um vetor não-replicativo em *Zymomonas*. O pMODPgaptaltktCm de plasmídeo foi tratado com transposase na presença de Mg^{2+} à temperatura ambiente por uma hora e usado para transformar células ZW1 através de eletroporação (com o uso de um Pulsador Gene da BioRad ajustado a 200 ohms, 25 μ F e 16 kV/cm). As células eletroporadas foram incubadas em um meio correspondente (MM), que consistem em 10 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de triptona, 2,5 g/L de $(NH_4)_2SO_4$, e 0,2 g/L de K_2HPO_4 suplementado com 50 g/L de glicose e 1 mM de $MgSO_4$ por 6 horas à 30° C. A mistura de transformação foi plaqueada em placas de ágar que contém 15 g/L de Bacto ágar em MM suplementado com 50 g/L de glicose e 120 μ g/mL de cloranfenicol e anaerobicamente incubada à 30° C. Os transformantes se tornaram visíveis após cerca de 2 dias. A frequência de transformação/transposição foi de aproximadamente de $3 \times 10^1/\mu$ g DNA.

[0117] Foi obtido Um total de colônias de transformantes de 39

Cm^r. Foram colhidas vinte e uma colônias e, ainda, analisadas através de ensaios de atividade enzimática e PCR. O PCR com o uso de *primers* SEQ ID Nº: 22 e 23 confirmaram a presença de um fragmento de DNA de 3 kb que contém as regiões codificadoras tal e tkt nos transformantes. A transformação inversa com DNA de plasmídeo a partir das 21 colônias integrantes não gerou transformantes inversos em *E. coli* sugerindo que a tal e tkt estavam integradas no genoma de ZW1. Estes integrantes foram testados para atividades de transaldolase e transcetolase com o uso de protocolos modificados para microplacas (Métodos Gerais). Foi usado ensaio de proteína Pierce BCA para a determinação da concentração de proteínas. Os transformantes foram cultivados em meio de RM que contém 2% (peso/volume) de glicose suplementado com 120 µg/ml de cloranfenicol) em tubos de centrifugas cônicas de 50 ml a 30° C. As cepas controle 8b e ZW1 foram cultivadas bem como para (RM mais 2% de glicose foi usado para ZW1) para ensaios enzimáticos. As células foram colhidas quando o OD₆₀₀ alcançou 1,0. As células foram submetidas à lavagem uma vez e resuspensas no tampão de sonificação (10 mM de Tris-HCl, pH 7,6 e 10 mM de MgCl₂). Os ensaios enzimáticos foram conduzidos conforme no pedido de patente publicado U.S. 20030162271. As unidades são dadas em µmol/min-mg. Com uma exceção, todas as amostras tiveram atividades de transaldolase e transcetolase.

[0118] Foi desempenhada a hibridização de *Southern* em DNA de plasmídeo e genômico de integrantes selecionados digeridos com PstI com o uso de uma sonda tkt. O DNA ZW1 não hibridizou com a sonda tkt. Uma faixa de 1.5 kb comum foi visível em todas as amostras de DNA genômicos integrantes, que é o fragmento de DNA esperado entre um sítio PstI em tkt e um sítio PstI em tal. Uma segunda faixa de alto peso molecular (6 kb ou maior) visível foi única entre as linhagens independentes T2, T3, T4 e T5 o que indica um sítio de integração genômico separado em cada linhagem. De forma

interessante, Tanto o plasmídeo quanto o DNA genômico da T5 hibridizada com a sonda tkt indicando provavelmente que Pgaptaltkt estava também integrado na T5 no plasmídeo nativo. Estas quatro cepas (T2, T3, T4 e T5) foram selecionadas para tratamento Cre adicional para remover o marcador Cm^r.

TRATAMENTO COM CRE PARA REMOVER O MARCADOR CM^R A PARTIR DE INTEGRANTES

TALTKT

[0119] Para remover o marcador Cmr a partir do cromossomo, T2, T3, T4 e T5 foram transformadas com pZB188/Spec-Cre. Este plasmídeo é um derivado do vetor ponte *Zymomonas*-*E.coli* pZB188 [Zhang *et al.* (1995) Science 267:240 a 243; US 5514583] que contém um cassete de expressão para Cre Recombinase. O pZB188/Spec-Cre é idêntico ao vetor de expressão Cre descrito no Exemplo 10 (pZB188/Kan-Cre), exceto pelo fato de que o mesmo tem um gene resistente à espectinomicina ao invés de um gene resistente à canamicina. Os transformantes foram selecionados em placas de Agar MM suplementadas com 2% de glicose e 200 µg/ml de espectinomicina). As colônias resistentes à Spr foram colhidas nas placas de Agar RM suplementadas com 2% de glicose e 200 µg/ml de espectinomicina e placas de Agar RM suplementadas com 2% de glicose e 120 µg/mL de Cm. Cem por cento das colônias colhidas foram Cms o que indica a excisão de alta eficiência de Cmr por Cre. Os transformantes SprCms foram cultivados em RM mais 2% de glicose à 37°C por 2 a 5 transferências diárias para curar pZB188aadACreF. Em cada transferência, as células foram diluídas e plaqueadas em placas de Agar RM mais 2% de glicose para colheita em placas adicionais do mesmo meio com ou sem 200 µg/mL de Sp. As colônias de Sps foram analisadas por PCR para confirmar a perda de pZB188aadACreF. Os descendentes curados por plasmídeo dos integrantes foram denominados T2C, T3C, T4C e T5C. Para examinar se estes integrantes de transposição ficaram estáveis, estas 4 cepas

foram cultivadas em RM mais 2% de glicose e, então, transferidas a 10 ml do mesmo meio e cultivadas à 37° C em tubos de teste duplicados. As células foram transferidas diariamente por dez dias, ou aproximadamente 100 gerações. As colônias foram diluídas e plaqueadas sobre placas RMG para isolamento de colônia após a primeira e a décima transferências. O teste de doze colônias de cada transferência de cada cepa apresentou resultado positivo para a presença de Pgaptaltkt por colônia PCR com o uso de *primers* 5' Pgap e 3' tkt (SEQ ID Nº; 13 e 23). As atividades de transaldolase e transcetolase também foram submetidas à medição para isolados após a primeira e a décima transferência (conforme descrito em Métodos Gerais). Todos os 4 integrantes apresentaram níveis similares tanto da atividade de TAL quanto TKT após 100 gerações no meio não-seletivo, o que sugere que estes integrantes foram geneticamente estáveis.

CONSTRUÇÃO DE PMODPGAPXYLABCM PARA TRANSPOSIÇÃO

[0120] A próxima etapa foi para integrar adicionalmente o operon PgapxylAB loxP::Cm aos integrantes (T2C, T3C, T4C e T5C) ZW1::Pgaptaltkt. O plasmídeo integrativo pMODPgapxylABCM foi construído com base no plasmídeo pMODPgaptaltktCm (descrito acima). O fragmento de DNA Pgaptaltkt foi removido através da digestão SacI/SfiI. Um fragmento adaptador que contém sítios de restrição SacI, NotI e SfiI foi introduzido por ligação. Um fragmento de NotI de PgapxylAB, que foi isolado do pZB4 (US 5514583), foi então clonado no sítio NotI do adaptador. A xilose isomerase (XI) é codificada por xylA e xiluloquinase (XK) é codificada por xylB. A sequência de nucleotídeo completa para o plasmídeo pMODPgapxylABCM é dada como SEQ ID Nº:24.

TRANSPOSIÇÃO E TRANSFORMAÇÃO DE PMODPGAPXYLABCM EM T2C, T3C, T4C E T5C

[0121] Com o uso de uma abordagem similar para a integração de PgaptaltktCm, T2C, T3C, T4C e T5C foram transformadas/transpostas com

pMODPgapxylABCm (descrito acima) tratado com transposase. Seis integrantes (T3CCmX1, T3CCmX2, T3CCmX3, T4CCmX1, T5CCmX1, T5CCmX2) foram obtidos em 2 experimentos de transformação/transposição seguintes à seleção Cm. Todos confirmaram presença de xylAB por PCR com o uso de dois conjuntos de *primers*: SEQ ID N°:25 e 26, e SEQ ID N°:15 e 16, com exceção de T2CcmX1 e T2CcmX6 a partir das quais nenhum fragmento de PCR foi detectado com o uso dos *primers* SEQ ID N°:25 e 26.

[0122] Os integrantes, incluindo as 2 linhagens negativas de PCR, foram submetidas aos ensaios para atividades de XI, XK, TAL e TKT (Métodos Gerais). Os resultados mostrados nas Figuras 2 e 3 indicaram que os seis integrantes xylAB T3CCmX1, T3CCmX2, T3CCmX3, T4CCmX1, T5CCmX1 e T5CCmX2 tiveram atividades de XI, XK, TAL e TKT. As atividades de XI e XK foram recentemente adquiridas quando compradas aos controles parentais negativos (Figura 2). As atividades de TAL e TKT foram mantidas como nos controles parentais. Todos os resultados indicaram que as proteínas foram produzidas e eram funcionais. Os níveis de atividade enzimática variaram com atividades de TI e XK similar àquelas dos integrantes ZW1 transformados/transpostos com o mesmo plasmídeo. Os níveis de atividade de XI, XK, TAL e TKT foram mais baixos que àqueles na cepa 8b.

[0123] A integração do operon *xylAB* foi confirmada através de hibridização Southern. Tanto o DNA de plasmídeo quanto o DNA genômico das 6 linhagens foram digeridos com SphI e hibridizados para uma sonda *xylB* marcada com digoxenina. Uma banda comum de cerca de 3 kb, que foi gerada a partir de um sítio SphI em *xylB* e outro sítio SphI nos sítios de clonagem adjacentes no vetor pMOD, esteve presente em todas as amostras de DNA genômico, e, em adição, bandas de hibridização de peso molecular maior nas amostras de DNA genômico indicaram que existiam quatro sítios de integração para o operon *PgapxylAB* no cromossomo. T3CCmX1 e T3CCmX2 aparentam

ter o mesmo sítio de integração, T3CCmX3 e T4CCmX1 podem ter o mesmo sítio de integração e T5CCmX1 e T5CCmX2 tem um sítio de integração separado cada. A digestão do mesmo DNA com PstI seguida de hibridização Southern com a sonda *tkl* demonstrou que cada integrante teve o mesmo padrão de hibridização conforme sua cepa parental respectiva.

ADAPTAÇÃO DOS INTEGRANTES ZW1::PgaptaltklPgapxylABCm EM MEIO DE XILOSE

[0124] Apesar da presença de todas as quatro atividades enzimáticas para a utilização de xilose, observações anteriores (pedido de patente publicado U.S.20030162271) indicaram que os integrantes não podem crescer imediatamente em xilose. O crescimento em xilose pode ocorrer após uma incubação prolongada em meio de xilose (tanto em tubos quanto em placas de teste), um processo denominado adaptação.

[0125] As cepas foram adaptadas conforme a seguir. As cepas do integrante ZW1::PgaptaltklPgapxylABCm foram inoculadas em tubos de teste contendo RMX (contendo 10 g/l de extrato de levedura, 2 g/l de KH₂PO₄, 20 g/l ou 2% (peso/volume) de xilose, assim como as placas de MMGX ou MMX (10 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de triptona, 2,5 g/L de (NH₄)₂SO₄, 0,2 g/L de K₂HPO₄, 1 mM de MgSO₄, 1,5% (peso/volume) de ágar, 0,025% (peso/volume) de glicose e 4% (peso/volume) de xilose ou apenas 4% (peso/volume) de xilose).

[0126] O baixo nível de glicose foi usado para suportar o crescimento inicial a fim de aumentar a chance de mutação durante a adaptação. Uma de ao menos cinco tentativas de adaptação em xilose em culturas e placas obteve sucesso. Após 10 dias de incubação anaeróbica a 30°C, 17 e 19 colônias foram visíveis em MMGX plaqueado com células T3CCmX1 e T3CCmX2, respectivamente. As colônias eram pequenas e não pareciam saudáveis (transparentes) sobre as placas. Doze colônias (quatro de

plaqueamento T3CCmX1: T3CCmX11, T3CCmX12, T3CCmX13 e T3CCmX110; oito de plaqueamento T3CCmX2: T3CCmX24, T3CCmX25, T3CCmX26, T3CCmX27, T3CCmX28, T3CCmX29, T3CCmX211 e T3CCmX212) foram inoculadas em RMGCm120 e transferidas em 3 ml de RMX para adaptação adicional a fim de obter linhagens capazes de crescer mais rapidamente em xilose.

[0127] A adaptação de integrantes em tubos de teste contendo 3 ml de RMX foi conduzida a 30°C. A OD₆₀₀ foi constantemente monitorada em um espectrofotômetro Spectronic 601. Quando o crescimento atingiu a fase média logarítmica, as culturas foram transferidas em tubos frescos de RMX. Esse processo foi continuado por 7 transferências. As taxas de crescimento e ODs (leituras não-lineares) finais foram aprimoradas ao longo das transferências.

[0128] Na sexta transferência, as culturas foram riscadas em placas de RMX para isolar colônias únicas. Três integrantes cresceram mais rápido do que outros em placas riscadas de RMX: T3CCmX13, T3CCmX26 e T3CCmX27, que foram referidos como X13, X26 e X27 nas tabelas e na discussão abaixo. Com a finalidade de selecionar os melhores promotores de xilose, quatro colônias grandes (L1a 4) e quatro pequenas (S1 a 4) para cada TX13, X26 e X27 foram selecionadas e cultivadas em tubos de teste de RMX, de modo que o crescimento, a utilização de açúcar e a produção de etanol puderam ser monitoradas. As colônias foram cultivadas de um dia para o outro a 30°C seguidas por inoculação de OD₆₀₀=0,05 em 3 ml de RMX em tubos de teste em duplicatas. A X27 cresceu mais lentamente em RMG do que as outras culturas e foi inoculada novamente 6,5 horas depois. Após 69 horas (62,5 horas para X27), as amostras foram tomadas para análise de HPLC (Métodos Gerais). A Figura 4 apresenta gráficos com o rendimento médio de etanol (% de rendimento teórico) e utilização de xilose (%) para culturas em 69 horas

(62,5 horas para todas as culturas X27). Não houve diferença entre as colônias pequenas e grandes. Embora o desempenho da X27 tenha sido melhor quando comparado à X26 em xilose, a mesma mostrou crescimento mais lento em glicose. Portanto, os melhores desempenhos, colônias grandes de X13 (X13L3) e X26 (X26L1), foram escolhidos para avaliação posterior em fermentações com pH controlado. As fermentações foram conduzidas em RMG (6% de glicose), RMX (6% de xilose) e RMGX (8%:4%; glicose:xilose) a 37°C para as cepas X13L3 e X26L1, assim como a cepa controle 8b. A fermentação de glicose por X13L3 e X26L1 cultivada em RMG (6%) e RMGX (8%:4%) procedeu muito rapidamente. A fermentação de xilose no RMGX (8%:4%) foi mais lenta tanto para X13L3 quanto para X26L1 quando comparada à fermentação da cepa 8b. Em adição, o crescimento em RMX (6%) a 37°C ocorreu após uma longa demora tanto para X13L3 quanto para X26L1. Inúmeros isolados, X13b, X13c e X13FL, foram recuperados a partir de fermentações de RMX (6%). Esses isolados juntamente com as cepas originais X13a (um isolado de X13L3) e X26 foram submetidos a um tratamento de Cre, conforme descrito previamente neste Exemplo, a fim de remover o marcador Cm^r das cepas *ZW1::PgaptaltktPgapyxylABCM*. O Cre tratado resultante, integrantes livres de Cm^r foram denominados: X13aC, X13bC, X13cC, X13FLC e X26C.

EXEMPLO 2

ADAPTAÇÃO E SELEÇÃO DA CEPA ZW658

[0129] Conforme previamente descrito, a adaptação das cepas *ZW1::PgaptaltktPgapyxylABCM* iniciais em RMX a 30°C aprimorou com grandeza o crescimento de cepas nessas condições. Entretanto, as cepas adaptadas sofreram um longo atraso durante o crescimento e fermentação em RMX (6%) a 37 °C. Para um aprimoramento adicional, os integrantes para fermentação de xilose em condições de processo que incluem maiores

temperaturas e concentrações de açúcar, o processo de adaptação ou evolutivo continuou em RMX (5%) a 37 °C. As transferências em série foram conduzidas e os melhores promotores de crescimento foram selecionados.

[0130] Os integrantes usados nesse processo incluíram X13aC, X13bC, X13cC, X26C e X13FLC. Essas 5 cepas foram cultivadas em RMX a 30°C por 6 transferências antes de serem transferidas para RMX (5%) a 37°C por outras 5 a 16 transferências. Durante e após todas as transferências, as culturas foram riscadas em placas de RMX e incubadas a 37°C a fim de isolar colônias únicas. As colônias grandes foram adicionalmente riscadas em placas de RMX e incubadas a 37°C por 3 a 4 vezes para purificar as colônias. As colônias grandes finais foram selecionadas para teste de crescimento em RMX (5%) a 37°C.

AValiação de cepas a partir da adaptação em meio de RMX (5%) a 37°C

[0131] Dezoito colônias isoladas após a adaptação com transferências em série foram testadas em tubos de teste de RMX (5%) a 37°C, inicialmente. Doze cepas foram selecionadas para uma segunda avaliação em tubo de teste. A cepa 8b foi incluída em todas as avaliações a título de comparação. As 18 colônias foram cultivadas em RMG a 37°C de um dia para o outro, centrifugadas e as células foram inoculadas em 4 ml de RMX (5%) a 37°C, estaticamente em tubos de teste para a primeira avaliação. Com base no crescimento (OD_{600} , não-linear) e os resultados de ponto final de HPLC (baixa xilose residual e alto etanol), 12 cepas foram selecionadas para a segunda avaliação.

[0132] Um dos propósitos da segunda avaliação foi testar a estabilidade do crescimento aprimorado em xilose e a capacidade de utilização de xilose das cepas. Todas as 12 cepas foram submetidas a um estudo de estabilidade para ver se as cepas adaptadas eram estáveis após serem expostas a um meio não seletivo no qual as mesmas foram transferidas em série a 37°C por

50 gerações. As culturas, antes e depois de transferências em RMG (5%), foram inoculadas em tubos de teste de RMX (5%) e cultivadas a 37°C para avaliação. Os ODs não-lineares foram monitorados através de leitura direta de tubos de teste em um espectrofotômetro Spectronic 601. Os ODs, na septuagésima hora de crescimento em RMX (5%), antes e após 50 gerações de crescimento em RMG, são plotados na Figura 5. Os resultados indicaram que a maioria das cepas se tornou estável após 50 gerações em RMG a 37° C. Os sobrenadantes de ponto final (na fase estacionária) também foram analisados através de HPLC para concentrações de xilose e etanol. A baixa xilose residual e altas concentrações de etanol nessas culturas suportaram o fato de que a cepa cresceu e fermentou em um poço com xilose.

[0133] Com base nos resultados a partir da avaliação de tubo de teste acima (baixa xilose residual, alta concentração de etanol e OD mais alto) e uma triagem de crescimento em placa de microtitulação subsequente com altas concentrações de glicose e/ou xilose (até 20%) e misturas de glicose e xilose com acetato para selecionar melhores promotores de crescimento em alto teor de açúcar e na presença de acetato, como a cepa N°26, denominada ZW658, que exibe o melhor desempenho geral.

EXEMPLO 3

ENSAIO DE ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DA VIA DE PENTOSE FOSFATO

[0134] As atividades das quatro enzimas de utilização de xilose codificadas por genes integrados (descritos no Exemplo 1) foram medidas conforme descrito nos Métodos Gerais para três dentre as cepas selecionadas para a adaptação em alta concentração de açúcar e a 37°C (do Exemplo 1) e foram comparadas às atividades das mesmas enzimas na cepa adaptada adicional ZW658 (do Exemplo 2). Os resultados, expressos em moles produto/mg proteína/minuto são mostrados na Tabela 1.

TABELA 1

**ATIVIDADES ENZIMÁTICAS EM DIFERENTES CEPAS DE *Z. MOBILIS* ADAPTADAS QUE
UTILIZAM XILOSE**

Cepa	Xilose isomerase	Xiluloquinase	Transaldolase	Transcetolase
X13bC	0,033 +/- 0,013	1,15 +/-0,13	1,66 +/-0,5	0,22 +/-0,02
ZW658	0,25 +/-0,033	4,41 +/-0,21	2,67 +/-1,0	0,19 +/-0,05

[0135] Os níveis de atividade para ambos os membros do operon *xylAB* foram aumentados por cerca de 4 a 8 vezes na cepa adaptada adicional ZW658 quando comparados aos níveis nas cepas precursoras parcialmente adaptadas. Houve pouca ou nenhuma alteração no nível de expressão de enzimas a partir do operon *tal/tkt* entre ZW658 e as cepas precursoras parcialmente adaptadas.

EXEMPLO 4

**COMPARAÇÃO DE SEQUÊNCIA DAS REGIÕES PROMOTORAS DOS OPERONS XYLAB EM
UMA CEPA PARCIALMENTE ADAPTADA E EM ZW658**

[0136] Visto que uma alteração clara nos níveis de atividade enzimática dos produtos de ambos os genes mediante o controle do promotor GAP (Pgap) que direciona *xylAB* foi um resultado observado da adaptação que levou à ZW658, a região promotora daquele operon a partir de uma cepa parcialmente adaptada (do Exemplo 1; subsequentemente dado o número de cepa ZW641) e a partir da ZW658 foi amplificada através de PCR e sequenciada. Um fragmento de PCR foi preparado com o uso de um *primer* direto de PCR (PC11; SEQ ID Nº:27) a partir da região codificadora recG onde o operon Pgap $xylAB$ foi integrado e um *primer* reverso só a partir da região codificadora *xylA* (PC12; SEQ ID Nº:28). O produto de PCR de 961 pb

resultante foi sequenciado com o uso de *primers* LM121, LM122 e LM123 (SEQ ID Nº: 29, 30 e 31). A sequência promotora a partir de ZW641 é dada na SEQ ID Nº: 3 e aquela a partir de ZW658, na SEQ ID Nº:4. Estas sequências promotoras foram encontradas para diferir em uma posição a partir da sequência descrita de Pgap na cepa de *Z. mobilis* CP4 (SEQ ID Nº:1): uma deleção de 1 base (de um T) após posição -21, que conta em direção à terminação 5' que começam *upstream* do códon de iniciação ATG para a região codificadora GAP. Essa alteração de sequência não contribui para qualquer diferença na expressão entre Pgap da ZW641 e Pgap da ZW658 desde que estejam presentes em ambas as cepas. Em adição a essa alteração comum – houve também uma única diferença de par de base única entre as sequências ZW641 e ZW658 Pgap. O G na posição -189 em relação ao ATG de iniciação na região codificadora para XylA na sequência a partir da cepa ZW641 foi trocado por um T na sequência a partir da ZW658. Nenhuma outra alteração entre as duas sequências foi notada e pareceu possível que uma alteração no nível de expressão devido a essa alteração de base única na região promotora GAP poderia ser responsável pelo aumento das atividades enzimáticas encontrado em ambas as proteínas codificadas por genes mediante o controle daquele promotor.

EXEMPLO 5

CONSTRUÇÃO DE UM VETOR DE EXPRESSÃO XILOSE ISOMERASE PARA *Z. MOBILIS* QUE TEM O MESMO PGAP QUE DIRECIONA O OPERON XYLA/B EM ZW641 DE *Z.*

MOBILIS

[0137] Uma construção de plasmídeo que confere resistência à espectinomicina e expressão de xilose isomerase de *E. coli* em *Z. mobilis* (pZB188/aada-GapXylA; onde Gap representa o promotor) foi gerada conforme descrito abaixo com o uso de um vetor de transporte de *E. coli/Z. mobilis* (pZB188) como material de iniciação (Figura 6A). As etapas envolvidas na

construção de pZB188 são descritas em U.S. 5.514.583. Brevemente, este plasmídeo de 7008 pb é capaz de se replicar em *E. coli* e *Z. mobilis* devido ao fato de ter duas origens diferentes de replicação, uma para cada espécie bacteriana. O pZB188 também contém fragmento de DNA que confere resistência à tetraciclina (isto é, um cassete-Tc^r). Essa primeira etapa na construção de pZB188/aada-GapXylA, foi para remover o cassete-Tc^r a partir de pZB188 e trocá-lo por um fragmento de DNA que confere resistência à espectinomicina (isto é, cassete-Spec^r). Com a finalidade de consumir o cassete-Tc^r a partir de pZB188, o plasmídeo foi cortado com ClaI e o grande fragmento de vetor resultante foi purificado por eletroforese em gel de agarose conforme descrito mais detalhadamente abaixo. O cassete-Spec^r foi gerado por PCR com o uso do plasmídeo pHP15578 (Cahoon *et al*, (2003) Nature Biotechnology 21: 1082 a 1087) como um modelo e *primers* 1 (SEQ ID Nº: 32) e 2 (SEQ ID Nº: 33). O plasmídeo pHP15578 contém a sequência de nucleotídeo completa para o cassete-Spec^r e seu promotor, que é baseado na sequência descrita do gene aadA do Transposon Tn7 (número de acesso X03043 do GenBank) que codifica para 3' (9)-O-nucleotidiltransferase.

[0138] *Primer* 1 (SEQ ID Nº: 32)

CTACTCATTTatcgatGGAGCACAGGATGACGCCT

[0139] *Primer* 2 (SEQ ID Nº:33)

CATCTTACTacgcgtTGGCAGGTCAGCAAGTGCC

[0140] As bases sublinhadas do *primer* 1 (*primer* direto) hibridizam apenas *downstream* a partir do promotor para o cassete-Spec^r (para nts 4 a 22 do número de acesso X03043 do GenBank), enquanto as letras minúsculas correspondem a um sítio ClaI adicionado à terminação 5' do *primer*. As bases sublinhadas do *primer* 2 (*primer* reverso) hibridizam cerca de 130 bases *downstream* a partir do códon de terminação (*stop codon*) para o cassete-Spec^r (para nts de 1002 a 1020 do número de acesso X03043 do GenBank),

enquanto as letras minúsculas correspondem a um sítio AflIII adicionado à terminação 5' do *primer*. O cassete-Specr gerado por PCR de 1048 pb foi duplamente digerido com ClaI e AflIII, e o fragmento de DNA resultante foi purificado com o uso do Kit de Purificação de PCR QIAquick (Qiagen, Cat. Nº. 28104) e o protocolo recomendado do vendedor. Na próxima etapa, o plasmídeo pZB188 (isolado a partir de *E. coli* SSC110 (dcm-, dam-) a fim de obter DNA de plasmídeo não-metilado para cortar com ClaI, que é sensível à dam metilação) foi duplamente digerido com ClaI e BssHII para remover o cassete-Tcr, e o fragmento do vetor grande resultante foi purificado por eletroforese em gel de agarose. Esse fragmento de DNA e o produto de PCR limpo foram então juntamente ligados, e a mistura de transformação de reação foi introduzida em *E. coli* JM110 com o uso de células quimicamente competentes que foram obtidas a partir de Stratagene (Cat. Nº. 200239). Observou-se que BssHII e AflIII geraram “terminações coesivas” (*sticky ends*) compatíveis, porém ambos os sítios são destruídos quando as mesmas estão juntamente ligadas. Os transformantes foram plaqueados em meio LB que continha espectinomicina (100 µg/ml) e cultivados a 37°C. Um transformante resistente à espectinomicina que continha um plasmídeo com a inserção de tamanho correto foi identificado por análise de digestão de restrição com NotI, e o plasmídeo que foi selecionado para manipulação posterior é referido abaixo por pZB188/aadA. Um diagrama em círculo dessa construção é mostrado na Figura 6B.

[0141] Na próxima etapa, um cassete de expressão de xilose isomerase de *E. coli* foi inserido entre os sítios NcoI e AclI de pZB188/aadA após cortar o último com ambas as enzimas e purificar o fragmento de vetor grande por eletroforese em gel de agarose. O fragmento de DNA de 2 Kpb, que serviu como o cassete de expressão de xilose isomerase de *E. coli*, foi isolado do plasmídeo pZB4 ao cortar a construção do último com NcoI e ClaI e ao

purificar o fragmento de DNA relevante por eletroforese em gel de agarose. O plasmídeo pZB4 é descrito em detalhe em U.S. 5514583, e uma representação esquemática do cassete de expressão de xilose isomerase de *E. coli* PgapXylA (SEQ ID Nº: 34) é mostrada no diagrama em caixa na Figura 6D.

[0142] O fragmento que contém o cassete de expressão de xilose isomerase de *E. coli* tem um sítio NcoI e um sítio ClaI e suas respectivas terminações 5' e 3'. Conforme descrito mais detalhadamente em U.S. Nº 5514583, este fragmento contém o promotor de gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAP) de *Z. mobilis* constitutivo forte (nts 316-619), que é precisamente fundida à fase de leitura aberta completa da fase de leitura aberta de *E. coli* xylA (nts de 620 a 1942) que codifica para xilose isomerase. O mesmo também contém a pequena região *stem-loop* que segue imediatamente o códon de terminação de xilose isomerase (nts de 1965 a 1999). O cassete de expressão de xilose isomerase de *E. coli* foi inserido entre os sítios NcoI e AclI de pZB188/aadA em uma reação de ligação padrão. Observa-se que ClaI e AclI geram “terminações coesivas” compatíveis, porém ambos os sítios foram destruídos quando os mesmos foram juntamente ligados. A mistura de reação de ligação foi então eletroporada em *E. coli* SSC110 (dcm-, dam-) para obter DNA de plasmídeo não-metilado para transformação subsequente de *Z. mobilis*, e as células transformadas foram plaqueadas em meio LB que contém 100 µg/ml de espectinomicina; o crescimento ocorreu a 37 °C. Os transformantes resistentes à espectinomicina, que têm um plasmídeo com uma inserção de tamanho correto, foram identificados por análise de digestão de restrição com NotI, NcoI e AclI. O plasmídeo que foi selecionado para manipulação posterior e superexpressão de xilose isomerase de *E. coli* na cepa ZW641 de *Z. mobilis* referido abaixo como “pZB188/aadA-641Gap-XylA”; um diagrama em círculo dessa construção de plasmídeo é mostrado na Figura 6C.

[0143] É importante observar que sequência de nucleotídeo de

SEQ ID Nº: 34 não é idêntica à sequência de nucleotídeo descrita em SEQ ID Nº: 34 no pedidos de patente co-pendentes e de propriedade comum US20080286870 e US20080187973, mesmo que isso corresponda ao mesmo cassete de expressão de xilose isomerase (PgapXylA) de *E. coli*. A sequência de DNA apresentada em SEQ ID Nº: 34 no presente trabalho tem uma deleção de 1 pb no Pgap que corresponde ao nt 599 da SEQ ID Nº: 34 nos pedidos de patente publicados U.S. 20080286870 e 20080187973. A sequência de nucleotídeo que foi reportada anteriormente nos relatórios descritivos foi baseada na sequência de DNA descrita do Pgap para a cepa CP4 de *Z. mobilis* (Conway *et al.* J. Bacteriol. 169 (12): 5653 a 5662 (1987)) e o promotor não foi resequenciado naquele momento. Recentemente, no entanto, se sabe que o Pgap em pZB4 também não tem o mesmo nucleotídeo, e o cassete de expressão de xilose isomerase (PgapXylA) de *E. coli* que foi usado para todos os três relatórios descritivos de patentes derivou a partir deste plasmídeo conforme observado acima.

EXEMPLO 6

GERAÇÃO DE UM VETOR DE EXPRESSÃO DE XILOSE ISOMERASE DE *E. COLI* QUE TEM O MESMO PGAP QUE DIRECIONA O OPERON XYL A/B EM ZW658 E ZW801-4 DE *Z.*

MOBILIS

[0144] O plasmídeo pZB188/aadA-801GapXylA é idêntico ao pZB188-aada-641GapXylA (Figura 6C) porém tem uma substituição de nucleotídeo única que corresponde à mutação G → T presente na posição -189 no Pgap que conduz a expressão do operon XylA/B de *E. coli* em ZW658. A mesma mutação pontual está presente nas cepas ZW800 e ZW801-4, que são sequencialmente derivadas de ZW658 conforme descrito abaixo. A construção e caracterização de ZW800 e ZW801-4 são detalhadamente descritas no pedido publicado co-pendente e de propriedade comum U.S. 11/862566. A ZW800 é uma derivada de ZW658 que tem uma inserção de cruzamento duplo

de um cassete resistente à espectinomicina na sequência que codificada a enzima de glicose-frutose oxidorreductase (GFOR) que inativa essa atividade. A ZW801-4 é uma derivada de ZW800 na qual o cassete resistente à espectinomicina foi apagado por recombinação de sítio específico que deixa um códon de terminação na fase que trunca prematuramente a proteína. Nenhuma dessas manipulações alteraram a sequência de nucleotídeo do promotor Pgap mutante que conduz o operon XylA/B em ZW658. Assim, o “promotor 801GAP” refere-se à sequência promotora presente nas seguintes cepas: ZW658, ZW800 e ZW801-4.

[0145] As etapas e intermediários de plasmídeo que foram usados para gerar pZB188/aadA-801GapXylA estão descritos abaixo em ordem cronológica a começar com o plasmídeo pMOD-ligante.

CONSTRUÇÃO DO PMOD-LIGANTE

[0146] O precursor para plasmídeo de pMOD-ligante foi o Vetor de Construção de Transposon pMOD™-2<MCS> (Cat. Nº MOD0602) comercialmente disponível a partir da EPICENTRE®. Conforme mostrado na Figura 7A, pMOD™-2<MCS> tem um gene resistente à ampicilina (ampR), uma origem de replicação de *E. coli* (ori), e um sítio multi-clonagem situado entre as duas terminações em mosaico (ME) que interage com transposase Tn5. A primeira etapa na construção do pMOD-ligante foi remover o sítio multi-clonagem original em pMOD2-<MCS> e substituí-lo por um novo sítio multi-clonagem que tem sítios de restrição únicos para AsiSi, FseI e SbfI. Isso foi feito ao cortar o plasmídeo com EcoRI e HindIII e ao purificar o fragmento de vetor grande (cerca de 2,5 Kpb) através de eletroforese em gel de agarose. O novo sítio multi-clonagem foi, então, gerado através do pareamento de dois oligonucleotídeos sintéticos juntos, Ligante B (SEQ ID Nº: 35) e Ligante T (SEQ ID Nº: 36) que ambos foram fosforilados em sua terminação 5'.

[0147] Ligante B (SEQ ID Nº: 35):

aattCTACCTGCAGGAGTAGGCGGCCCATGAGCGATCGCA

[0148] Ligante T (SEQ ID Nº: 36):

agctTGGGATCGCTCATGGCGGCCCTACTCCTGCAGGTAG

[0149] Esses oligonucleotídeos são complementares entre si, e quando são juntamente repareados, formam um ligante de filamento duplo que tem uma projeção de filamento único em ambas as terminações (letras minúsculas), que permite ao fragmento de DNA ser ligado entre os sítios EcoRI e HindIII do fragmento de vetor pMOD™-2<MCS> grande descrito acima. Conforme registrado acima, esse ligante sintético também contém três sítios de restrição únicos (AsiSI, FseI e SbfI) que podem ser usados para as etapas de clonagem subsequentes. O sítio SbfI é sublinhado com uma linha delgada, o sítio FseI é sublinhado com uma linha grossa e o sítio AsiSI é sublinhado com duas linhas delgadas. O Ligante B e o Ligante T foram juntamente repareados e o fragmento de DNA resultante foi inserido entre os sítios EcoRI e HindIII de pMOD™-2<MCS> em uma reação de ligação padrão. A mistura de reação de ligação foi usada para transformar DH10B de *E. coli* e as células transformadas foram plaqueadas em meio LB que continha 100 µg/ml de ampicilina. O DNA de plasmídeo foi então isolado a partir de uma colônia resistente à ampicilina representativa que continha o novo sítio multi-clonagem. Um diagrama em círculo da construção do plasmídeo resultante (referido abaixo como “pMOD-ligante”) é mostrado na Figura 7B.

CONSTRUÇÃO DE PMOD-LIGANTE-SPEC

[0150] Um fragmento de DNA que confere resistência à espectinomicina (Specr) e tem um sítio loxP do tipo selvagem em ambas as terminações foi inserido entre os sítios AsiSI e FseI da construção pMOD-ligante descrita acima. A fonte do cassete loxP-flanked Spec foi plasmídeo pLDH-Sp-9WW (Figura 8), que é descrito detalhadamente no pedido de patente U.S. 11/862566. Na primeira etapa, DNA de plasmídeo MOD-ligante foi

sequencialmente digerido com FseI e AsiSI, e o fragmento de vetor grande foi purificado com o uso do kit de coluna de centrifugação DNA Clean & Concentrator™-5 que foi adquirido em Zymo Research Corporation (Cat. Nº DO4003). Depois, plasmídeo pLDH-Sp-9WW foi também duplamente digerido com as mesmas duas enzimas e o fragmento de DNA pequeno (cerca de 1,1 Kpb), que continha o cassete loxP-flanked Spec, foi purificado através de eletroforese em gel de agarose. Os dois fragmentos de DNA de interesse foram então juntamente ligados, e a mistura de reação de transformação foi introduzida em DH10B de *E. coli* com o uso de eletroporação. Os transformantes foram plaqueados em meio LB que continham ampicilina (100 µg /ml) e espectinomicina (100 µg /ml) e o crescimento se deu a 37°C. O DNA de plasmídeo foi então isolado de uma dentre as colônias resistentes à ampicilina que continha um fragmento de DNA com a dimensão correta e isto foi usado para manipulações subsequentes. Um diagrama em círculo desta construção (referido abaixo como “pMOD-ligante -Spec”) é mostrado na Figura 7C.

CONSTRUÇÃO DE PMOD-LIGANTE-SPEC-801GAPXYLA E PMOD-LIGANTE-SPEC-641GAPXYLA

[0151] Um fragmento de DNA que contém Pgap inteiro, a região codificadora XylA, e a região *stem-loop*, que está entre as regiões de leitura aberta XylA e XylB, foram amplificadas através de PCR a partir de ZW801-4 com o uso dos *primers* 3 e 4 (SEQ ID Nº: 37 e 38, respectivamente) e as células suspensas novamente como um modelo. Conforme registrado previamente, a análise de sequência de DNA mostrou que ZW801-4 tem a mesma mutação pontual G → T na posição -189 no promotor Pgap que conduz a expressão do operon XylA/B de *E. coli* integrado como ZW658 e que o Pgap em ambas as cepas são idênticos.

[0152] *Primer* 3 (SEQ ID Nº: 37)

TCACTCATggccggccGTTTCGATCAACAACCCGAATCC

[0153] *Primer 4* (SEQ ID Nº: 38)

CTACTCATcctgcaggCCGATATACTTATCGATCGTTCC

[0154] As bases sublinhadas do *primer 3* (*primer* direto) hibridizam as primeiras 22 bases do Pgap (e para nts de 316 a 337 de SEQ ID Nº: 34, enquanto as letras minúsculas correspondem a um sítio FseI que foi adicionado à terminação 5' do *primer*. As bases sublinhadas do *primer 4* (*primer* reverso) hibridizam apenas *downstream* a partir da região *stem-loop* que está após o códon de terminação XylA (e para as últimas 12 nts de SEQ ID NO: 34), enquanto as letras minúsculas correspondem a um sítio SbfI que foi adicionado à terminação 5' do *primer*.

[0155] O produto de PCR foi duplamente digerido com FseI e SbfI, e purificado com o uso do kit de coluna de centrifugação DNA Clean & Concentrator™-5 que foi adquirido junto à Zymo Research Corporation (Cat. Nº DO4003). Depois, o plasmídeo pMOD-ligante-Spec foi cortado com as mesmas duas enzimas e o fragmento de vetor grande resultante foi purificado com o uso do mesmo procedimento. Os dois fragmentos de DNA de interesse foram, então, juntamente ligados e a mistura de reação de transformação foi introduzida em DH10B de *E. coli* com o uso de eletroporação. As células foram plaqueadas em meio de LB que continha ampicilina (100 µg /ml) e espectinomicina (100 µg /ml) e o crescimento se deu a 37°C. Os transformantes que continham um plasmídeo com uma inserção de dimensão correta foram identificados através de PCR com o uso dos *primers 3* e *4* e as colônias suspensas novamente como um modelo ("colônia PCR"). O plasmídeo que foi selecionado para manipulação adicional é referido abaixo como pMOD-ligante-Spec-801GapXylA, e um diagrama em círculo desta construção é mostrado na Figura 9.

[0156] As mesmas etapas descritas acima foram usadas para

gerar outro plasmídeo que é referido abaixo como “pMOD-ligante-Spec-641GapXylA”, exceto o modelo que foi usado para amplificação por PCR do fragmento de DNA de gene Pgap-XylA foi uma suspensão celular de ZW641. pMOD-ligante-Spec-O 641GapXylA e pMOD-ligante-Spec-801 GapXylA são idênticos à exceção da substituição G → T no Pgap que distingue ZW658 (e ZW801-4) de ZW641.

CONSTRUÇÃO DE PZB188-AADA-801GAPXYLA

[0157] Conforme descrito no primeiro parágrafo do Exemplo 6, o pZB188-aadA-801GapXylA é um vetor de expressão de Xilose Isomerase de *E. coli* para *Z. mobilis* que é idêntico ao pZB188-aadA-641GapXylA, porém tem a mesma substituição G → T no Pgap que conduz a expressão do operon Pgap-XylA/B integrado em ZW658 (e ZW801-4). Para construir esse plasmídeo, o pMOD-ligante-Spec-801GapXylA (Figura 10A) foi duplamente digerido com MluI e Sall e o fragmento de DNA menor (cerca de 1100 pb) foi purificado com o uso de eletroforese em gel de agarose e do Kit de Recuperação de DNA Zymoclean Gel (catálogo nº D4001, Zymo Research). Esse fragmento contém a substituição G → T de Pgap e parte do ORF de XylA e foi usado para substituir o fragmento correspondente em pZB188-aadA-641GapXylA (Figura 10B), após cortar a construção de último com as mesmas duas enzimas e purificar o fragmento de vetor grande através de eletroforese em gel de agarose. Os dois fragmentos de interesse foram então juntamente ligados e a mistura de reação de ligação foi introduzida em DH10B de *E. coli* com o uso de eletroporação. Os transformantes foram plaqueados em meio de LB que continha espectinomicina (100 µg/ml) e o crescimento se deu a 37°C. O DNA de plasmídeo foi isolado a partir de uma colônia resistente à espectinomicina e a presença da substituição G → T do promotor Pgap foi confirmada através da análise de sequência de DNA. O plasmídeo usado para manipulações subsequentes, (“pZB188-aadA-801GapXylA”) é mostrado na Figura 10C.

EXEMPLO 7

SUPEREXPRESSÃO DE XILOSE ISOMERASE DE *E. COLI* EM ZW641

[0158] As medições de atividade enzimática na Tabela 1 mostram que as atividades de xilose isomerase e de xiluloquinase aumentaram drasticamente durante a transição de ZW641 para ZW658. A fim de testar a hipótese de que xilose isomerase é a enzima reguladora para o crescimento em xilose em ZW641, a enzima foi superexpressa nessa cepa com o uso do plasmídeo multicópia, pZB188/aadA-641GapXylA (Figura 6C). O controle para esse experimento foi ZW641 transformado com o plasmídeo multicópia pZB188/aadA, que necessita de cassete de expressão de xilose isomerase Pgap de *E. coli* (Figura 6B). A construção de ambos desses plasmídeos é descrita no Exemplo 5 e o protocolo de transformação foi essencialmente conforme descrito no Exemplo 5 do pedido de patente publicado co-pendente e de propriedade comum US20080187973. Brevemente, o DNA de plasmídeo não-metilado (isolado a partir de SSC110 de *E. coli*, que é uma cepa dcm- e dam-) foi introduzido em ZW641 com o uso de eletroporação, e as células transformadas foram plaqueadas em meio de LB que continha 200 µg/ml de espectinomicina.

[0159] Após um período de crescimento de 48 horas à 30°C sob condições anaeróbicas, três transformantes primários foram selecionados aleatoriamente para cada plasmídeo, e estes foram excisados (transferidos) para placas de ágar que continham o mesmo meio de crescimento para caracterização adicional.

[0160] A Figura 11 mostra curvas de crescimento (OD600 versus tempo) em meio que contém xilose para três cepas que abrigaram o plasmídeo de expressão de xilose isomerase 641Pgap de *E. coli* (X1, X2 e X2) e as três cepas que abrigaram o plasmídeo de controle (C1, C2 e C3). Esse experimento foi executado a 30°C em frascos de agitação (culturas de 5 ml em tubos de 15

ml a 150 rpm), e o meio de crescimento foi mRM3-X10 (10 g/L de extrato de levedura, 2 g/L de KH_2PO_4 , 1 g/L de MgSO_4 e 100 g/L de xilose) que também continha espectinomicina (200 $\mu\text{g/ml}$).

[0161] As culturas foram iniciadas com um ciclo (*loop*) de células a partir da placa excisada descrita no parágrafo acima e o OD600 inicial em cada caso foi de cerca de 0,13. Similar a ZW641, as três cepas com o plasmídeo de controle mal cresceram em xilose. Em contraste marcado, tanto a taxa quanto a extensão do crescimento (valores de OD600 finais) em xilose foram drasticamente melhoradas quando ZW641 foi transformada com o plasmídeo de expressão de xilose isomerase 641P*gap* de *E. coli*, pZB188/aadA-641GapXylA. Já que todas as três cepas que tinham este plasmídeo se comportaram do mesmo modo no experimento que é mostrado na Figura 11, apenas a cepa X1 e a cepa C1 foram submetidas à caracterização adicional.

[0162] A Figura 12 mostra uma comparação lado a lado de ZW641, ZW658, X1 e C1 no mesmo meio de crescimento que contém xilose sem espectinomicina. As condições para esse experimento eram idênticas às aquelas descritas acima, mas as culturas de 20 ml foram cultivadas em tubos de 50 ml e os OD600s iniciais eram cerca de 4 vezes inferiores (0,035). As curvas de crescimento mostradas na Figura 12A são organizadas em uma escala linear (OD600 versus Tempo), enquanto a Figura 12B mostra os mesmos dados experimentais organizados em uma escala logarítmica (logOD600 versus Tempo) para que se compare as taxas de crescimento exponenciais. Fica aparente a partir deste experimento que a taxa de crescimento exponencial de X1 é quase tão rápida quanto à cepa adaptada à xilose ZW658, e que esta cepa cresce muito melhor em xilose do que a cepa parental ZW641 com ou sem o plasmídeo de controle.

[0163] Assim, a alta expressão de xilose isomerase em ZW641 (conduzida por um promotor 641P*gap* de um plasmídeo multicópia) tem um

efeito similar no crescimento em xilose do que o aumento em atividade de xilose isomerase teve em ZW658 (mostrado na Tabela 1). Embora o rendimento de biomassa final para X1 seja cerca de 2 vezes mais baixo que aquele obtido com ZW658, fica claro a partir desses dados que a enzima limitadora de taxa para crescimento em xilose em ZW641 é xilose isomerase. Os experimentos mostrados nas Figuras 11 e 12 sugerem, ainda, duas outras possibilidades interessantes: (1) que o grande aumento na atividade de xilose isomerase que ocorreu durante a transição de ZW641 para ZW658 (Tabela 1) foi, em grande parte, responsável para o melhor crescimento em xilose que ocorreu durante o processo de “adaptação de xilose”; e (2) que o aumento na atividade de xilose isomerase pode ter resultado da substituição G → T no promotor *Pgap* que conduz a expressão do operon *Pgap-XylA/B* integrado cromossomicamente que está presente em ZW658.

EXEMPLO 8

INTEGRAÇÃO MEDIADA POR TRANSPOSON DE XILOSE ISOMERASE DE *E. COLI* EM

ZW641

[0164] ZW641 e duas construções de plasmídeo (pMOD-ligante-Spec-801GapXylA e pMOD-ligante-Spec-641GapXylA) foram usadas para testar a hipótese de que o promotor *Pgap* com a substituição G → T que conduz a expressão do operon XylA/B integrado em ZW658 (de agora em diante referido como o “promotor 801GAP”) é mais forte do que o promotor correspondente em ZW641 (de agora em diante referido como o “promotor 641GAP”). ZW641 foi selecionada para esses experimentos visto que dificilmente é capaz de crescer em xilose e porque a superexpressão de xilose isomerase nessa cepa resulta em crescimento mais rápido em xilose (Exemplo 7, Figuras 11 e 12). A ideia básica era introduzir uma cópia extra do gene da xilose isomerase de *E. coli* (conduzida pelo promotor 641GAP ou pelo promotor 801GAP) no cromossomo de ZW641 e ver qual construção resultaria em um

crescimento mais rápido em xilose. A integração cromossômica dos dois genes quiméricos foi realizada com o uso da tecnologia de transposoma do Epicentre.

[0165] Conforme já indicado, pMOD-ligante-Spec-641GapXylA e pMOD-ligante-Spec-801GapXylA são plasmídeos idênticos exceto pela mutação pontual G → T que está presente no promotor *Pgap* na última construção. O elemento reversível usado para inserção aleatória em DNA em ambos os casos consistia em duas terminações em mosaico (MEs) 19 pb e todo o fragmento de DNA que está ensanduichado entre elas. Conforme mostrado na Figura 9, este elemento, que é referido como o transposon, contém um cassete de resistência a espectinomicina (Spec^r) e um cassete de expressão de xilose isomerase *downstream Pgap* de *E. coli*. O protocolo que foi usado para formar os transposomas foi essencialmente o mesmo que aquele descrito no manual de instruções do Epicentre para o Vetor de Construção Transposon EZ::TN™pMOD™-2<MCS> (Cat. No. MOD0602). A reação de 8 µL continha 1,5 µL de transposon de DNA de terminações cegas 5'-fosforilado, que era livre de íons de Mg⁺⁺ (cerca de 250 ng/µL), 4 µL de EZ::TN Transposase do Epicentre e 2,5 µL de 80% (v/v) glicerol. A mistura de reação de transposoma de controle era idêntica, mas 4 µL de água esterilizada foram substituídos pela transposase. As reações foram incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos e, então, transferidas para 4°C por um período de incubação de 2 a 7 dias que é exigido para a etapa de isomerização vagarosa, que resulta na formação do transposoma ativo; com o uso deste procedimento os transposomas são estáveis por ao menos 3 meses a -20 °C.

[0166] Os transposomas foram eletroporados em ZW641 essencialmente usando o mesmo protocolo de transformação que é descrito em US 5.514.583. Brevemente, as reações de transformação de 40 µL continham cerca de 10¹⁰ células/ml em 10% (v/v) de glicerol, 1 µL de Inibidor de Restrição TypeOne™ da Epicentre (Cat. No. TYO261H) e 1 µL da reação de

mistura de transposoma ou controle. As configurações para o eletroporador foram 1,6 kv/cm, 200 Ω , e 25 μ F, e a largura de vão do cadinho era de 0,1 cm. Seguindo a eletroporação, as reações de transformação foram diluídas com 1,0 ml de meio MMG (50 g/L de glicose, 10 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de triptona, 2,5 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,2 g/L K_2HPO_4 , e 1 mM MgSO_4) e permitiu-se que as células se recuperassem por cerca de 3 horas a 30°C. As células foram, então, colhidas por centrifugação à temperatura ambiente (13000 X g, 5 minutos) em tubos de microfuge de 1,5 ml esterilizados e o sobrenadante foi cuidadosamente removido. *Pellets* de célula foram resuspensores em 200 μ L de meio MMG líquido e uma alíquota de 100- μ L de cada suspensão de célula foi plaqueada em meio MMG que continha 1,5% de ágar e 200 μ g/ml de espectinomicina. Após um período de incubação de 72 horas a 30°C sob condições anaeróbicas, 3 colônias estavam na placa de controle, 13 colônias estavam na placa de transposoma 641GapXylA e 18 colônias estavam na placa de transposoma 801GapXylA. Seis colônias de ambas as placas de transposoma foram aleatoriamente selecionadas para caracterização adicional, e estas foram excisadas em placas de ágar que continham meio MMX e 200 μ g/ml de espectinomicina; as condições de crescimento foram conforme descrito acima. O meio MMX é o mesmo que o meio MMG, mas contém 50 g/L de xilose ao invés de glicose. Após uma segunda rodada de crescimento em placas de espectinomicina mais MMX fresco, as seis cepas que cresceram melhor em xilose (três para cada transposoma) foram usadas para o experimento descrito abaixo.

[0167] A Figura 13A mostra as curvas de crescimento lineares para as três cepas ZW641 que foram obtidas com o transposoma 641Gap-XylA (Nº 6-1, Nº 6-3 e Nº 6-5) e as três que receberam o transposoma 801Gap XylA (Nº 8-2, Nº 8-4 e Nº 8-5) em meio que contém xilose. Os mesmos dados são organizados em uma escala de log na Figura 13B. Este experimento foi

executado a 30°C em frascos de agitação (culturas de 7 ml em tubos de 15 ml a 150 rpm), e mRM3-X10 (10 g/L de extrato de levedura, 2 g/L de KH₂PO₄, 1 g/L de MgSO₄ e 100 g/L de xilose) foi o meio de crescimento. As culturas foram iniciadas com um *loop* de células a partir da placa excisada descrita acima e os ODs iniciais foram muito similares (cerca de 0,02 a 0,03). O controle para este experimento foi a cepa adaptada para xilose ZW658, que tem a substituição G → T no *Pgap* que conduz o operon cromossomicamente integrado de *E. coli* XylA/B.

[0168] Similar à cepa parental (ZW641), as três cepas que tinham uma cópia extra cromossomicamente integrada do cassete de expressão 641GapXylA cresceram de modo insatisfatório em meio que contém xilose, embora fosse aparente que existiram pequenas melhorias tanto na taxa de crescimento quanto no rendimento de biomassa (OD₆₀₀), especialmente para a cepa N^o 6-5 (comparar a Figura 12A e a Figura 13A). Em contraste, todas as três cepas que foram obtidas com o transposon 801GapXylA cresceram muito melhor em xilose do que a cepa parental (Figuras 13A e 13B). Na verdade, dois dos transformantes (N^o 8-4 e N^o 8-5) cresceram quase tão bem quanto neste açúcar como os transformantes ZW658 e ZW641 que abrigaram o plasmídeo de multicópia pZB188/aadA-GapXylA, que contém um cassete de expressão 641GapXylA (comparar a Figura 12 e a Figura 13). Já que transposição é um evento aleatório e todas as seis cepas têm o cassete de expressão 641GapXylA ou 801GapXylA inserido em diferentes locais no cromossomo, é provável que as diferenças na expressão de gene estranho que foram observadas neste experimento usando o mesmo transposoma sejam devido a efeitos posicionais. Por exemplo, os efeitos de posição podem ser responsáveis pelo crescimento melhor do N^o 6-5 do que do N^o 6-1 e do N^o 6-3, e pelo crescimento pior do N^o 8-2 do que do N^o 8-4 8-5. Todavia, apesar do pequeno tamanho da população que foi analisada, os resultados que são

mostrados na Figura 13 apoiam fortemente a noção de que a mutação G → T que está presente no promotor *Pgap* que direciona o operon de *E. coli* XylA/B em ZW658 e ZW801-4 é responsável pela atividade de xilose isomerase mais alta e pelo melhor crescimento em xilose que é observado nestas cepas, se comparado à cepa parental ZW641.

EXEMPLO 9

PROMOTOR 801GAP DIRECIONA NÍVEIS DE EXPRESSÃO MAIS ELEVADOS DE RIBOSE 5-FOSFATO ISOMERASE EM *Z. MOBILIS* DO QUE O PROMOTOR 641GAP

[0169] Se o promotor 801GAP é realmente mais forte do que o promotor 641GAP, seu efeito estimulatório na expressão não deve ser restrito ao gene xilose isomerase de *E. coli* e uma expressão melhorada de outras proteínas com esse promotor também é esperada. Para tratar dessa importante questão, o gene de *Z. mobilis* que codifica para ribose 5-fosfato isomerase (RPI) foi fundido a ambos os promotores e os genes quiméricos foram inseridos em um plasmídeo multicópia que se replica em *Z. mobilis*. Os plasmídeos de expressão de *Pgap*-RPI resultantes (pZB188/aadA-641GapRPI e pZB188/aadA-801GapRPI) foram introduzidos em *Z. mobilis* e níveis de expressão de RPI foram analisados por SDS-PAGE conforme descrito abaixo.

CONSTRUÇÃO DE pZB188AAD/GAP/ZYMO RPI/ECOLI SL

[0170] O plasmídeo pZB188aadA/Gap/Zymo RPI/EcoliSL foi um importante intermediário na construção dos dois plasmídeos de expressão de *Pgap*-RPI que foram usados na presente invenção. Conforme mostrado na Figura 14, esse plasmídeo contém um cassete de expressão para o gene ribose 5-fosfato isomerase (RPI) de *Z. mobilis* que está localizado entre os sítios NcoI e XhoI únicos.

[0171] Uma sobreposição da técnica de PCR descrita abaixo foi usada para gerar o cassete de expressão de RPI, que é um gene quimérico que contém a sequência de comprimento extenso do promotor

641GAP (nts de 316 a 619 da SEQ ID N^o:34) e a fase de leitura aberta completa do gene RPI de *Z. mobilis*. O ORF de RPI corresponde a nts de 1224730 a 1225203 do genoma de *Z. mobilis* (número de acesso AE008692 do GenBank) e o códon de iniciação do RPI é fundido diretamente à terminação 3' do promotor 641GAP.

[0172] O modelo para o promotor 641Gap foi pZB188/aadA-641GapXylA e um fragmento de DNA de 320 pb foi amplificado a partir desse plasmídeo com o uso dos *primers* 5 e 6 (SEQ ID N^{os}:39 e 40, respectivamente) em uma reação de PCR. O produto de PCR resultante contém o promotor 641GAP e os primeiros 15 pb do ORF de RPI de *Z. mobilis* que são fixados às suas terminações 3' começando com o códon de iniciação GTG. Esse fragmento também tem um único sítio NcoI em sua terminação 5' (letras minúsculas) que foi adicionado à terminação 5' do *primer* 5 para propósitos de clonagem.

[0173] *Primer* 5 (SEQ ID N^o:39)

CATGccatggGAGCTCGTTTCGATCAACAACCCGAATCCTA

[0174] *Primer* 6 (SEQ ID N^o:40)

CACAGCAGAGGTCACGTTTATTCTCCTAACTTATTAAGTAGC

[0175] Em uma reação de PCR separada, os *primers* 7 e 8 (SEQ ID N^{os}:41 e 42, respectivamente) foram usados para gerar um fragmento 473 pb que contém todo o ORF do gene nativo RPI de *Z. mobilis*. O modelo que foi usado para amplificação foi DNA genômico que foi isolado a partir da cepa ZW801-4 de *Z. mobilis*. Nota-se que a terminação 5' do *primer* 7 tem 15 pb de uma sequência de sobreposição que pode hibridizar até a terminação 3' do fragmento do promotor 641GAP 320 pb e que um sítio XhoI (letras minúsculas) foi adicionado à terminação 5' do *primer* 8 para propósitos de clonagem.

[0176] *Primer* 7 (SEQ ID N^o:41)

GTTAGGAGAATAAACGTGACCTCTGCTGTGCCATCAAA

[0177] *Primer 8* (SEQ ID N°:42)

CCGctcgagCTAGATATTGAACTGAGGATTCTGAAA

[0178] Os dois fragmentos descritos acima foram, então, submetidos a uma reação de PCR de sobreposição com o uso dos *primers* 5 e 8 (SEQ ID N°s:39 e 42, respectivamente), e essa manipulação resultou na geração do cassete de expressão de RPI. O último é um fragmento 778 pb que contém o promotor 641GAP fundido diretamente ao códon de partida do ORF de RPI de *Z. mobilis*. O produto de PCR foi, então, cortado com NcoI e XhoI, e o fragmento resultante foi inserido nos sítios NcoI e XhoI de um plasmídeo que foi basicamente derivado de pZB188/aadA-641GapXylA (Figura 6C) para render o produto final pZB188aadA/Gap/Zymo RPI/EcoliSL (Figura 14). É importante notar que esse plasmídeo, que é um vetor de expressão de RPI para *Z. mobilis*, também contém a região *stem-loop* que está presente na região intergênica do operon XylA/B de *E. coli* e que esse elemento de estabilização está localizado entre os sítios XhoI e NotI justamente *downstream* do códon de terminação RPI. A sequência de nucleotídeo do cassete de expressão de RPI que está no plasmídeo pZB188aadA/Gap/Zymo RPI/EcoliSL (incluindo a estrutura *stem-loop* XylA) é descrita na SEQ ID N°:43. A sequência de nucleotídeo que é mostrada corresponde ao fragmento de DNA que está localizado entre os sítios NcoI e NotI e inclui ambos os sítios de restrição.

CONSTRUÇÃO DE PZB188/AAD-641GAPRPI E PZB188/AAD-801GAPRPI

[0179] O pZB188/aadA-641GapRPI e pZB188/aadA-801GapRPI são plasmídeos de expressão de Pgap-RPI para *Z. mobilis* que são idênticos, exceto pela última construção que tem a substituição G → T que distingue o promotor 801GAP do promotor 641GAP. Um fragmento de DNA 1240 pb que se originou a partir de pZB188aadA/Gap/Zymo RPI/EcoliSL foi usado para converter pZB188/aadA-641GapXylA (Figura 6C) para pZB188/aadA-641GapRPI (Figura 15B) e pZB188/aadA-801GapXylA (Figura 10C) para

pZB188/aadA-801GapRPI (Figura 15C). Esse pedaço de DNA foi gerado através do corte de pZB188aadA/Gap/Zymo RPI/EcoliSL com AsiSI e NheI e da purificação do menor fragmento através de eletroforese em gel de agarose. Conforme mostrado na Figura 15A, o pZB188aadA/Gap/Zymo RPI/EcoliSL tem sítios de restrição únicos AsiSI e NheI e os mesmos sítios também se apresentam em pZB188/aadA-641GapXylA e pZB188/aadA-801GapXylA. Nota-se que AsiSI cliva todos os três desses plasmídeos no Pgap de modo *downstream* a partir da substituição G → T que distingue o promotor 801GAP do promotor 641GAP e que NheI corta a estrutura de plasmídeo cerca de 700 pb *downstream* dos códons de terminação XylA ou RPI. O fragmento de DNA 1240 pb que foi obtido a partir de pZB188aadA/Gap/Zymo RPI/EcoliSL, portanto, contém um pequeno segmento de DNA que o promotor 641Gap e o promotor 801GAP dividem em comum, a fase de leitura aberta de RPI completa e a região de *stem-loop* XylA de estabilização.

[0180] Na próxima etapa na construção de pZB188/aadA-641GapRPI e pZB188/aadA-801GapRPI, o fragmento de DNA 1240 pb descrito acima foi inserido entre os sítios AsiSI e NheI em pZB188/aadA-641GapXylA e pZB188/aadA-801GapXylA em duas reações de ligação separadas, após o corte desses plasmídeos com AsiSI e NheI e da purificação dos maiores fragmentos de vetor. Ambas as misturas de reação de ligação foram introduzidas em DH10B de *E. coli* com o uso de eletroporação e os transformantes foram plaqueados em meio de LB que continha espectinomicina (100 g/ml); o crescimento foi a 37°C. Finalmente, DNA de plasmídeo pZB188/aadA-641GapRPI (Figura 15B) e pZB188/aadA-801GapRPI (Figura 15C) foi isolado a partir das colônias que continham a construção correta (como confirmado através da análise de sequência de DNA) e ambos os plasmídeos foram, então, introduzidos em SCS110 de *E. coli* (dam-, dcm-) para gerar DNA não-metilado para transformação de *Z. mobilis*.

EXPRESSÃO DE RPI COM O PROMOTOR 641GAP E O PROMOTOR 801GAP

[0181] Os dois vetores de expressão de Pgap-RPI descritos acima (pZB188/aadA-641GapRPI e pZB188/aadA-801GapRPI) foram introduzidos na cepa ZW1 de *Z. mobilis* de tipo selvagem com o uso de eletroporação e DNA de plasmídeo não-metilado. As células transformadas foram cultivadas anaerobicamente a 30°C em placas de 1,5% de ágar que continham meio de MMG (50 g/L de glicose, 10 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de triptona, 2,5 g/L de (NH₄)₂SO₄, 0,2 g/L de K₂HPO₄ e 1 mM de MgSO₄) e 200 µg/ml de espectinomicina. Duas colônias aleatoriamente selecionadas que continham o plasmídeo 641GAP-RPI (641gapRpi N°1 e 641gapRpi N°2) e duas que abrigaram o plasmídeo 801GAP-RPI (801gapRpi N°1 e 801gapRpi N°2) foram excisadas sobre uma placa de 1,5% de ágar que continha o mesmo meio de crescimento e a placa foi incubada por cerca de 24 horas a 30°C mediante condições anaeróbicas. Essa placa foi usada para iniciar a cultura de semente para o experimento de expressão de RPI.

[0182] As culturas de semente foram iniciadas com um ciclo (*loop*) de células e foram cultivadas a 30°C (150 rpm) em tubos tapados de 15 ml que continham 5 ml de meio de MMG e espectinomicina (200 µg/ml). O controle para esse experimento (a cepa parental, ZW1) foi cultivado sob as mesmas condições, mas o meio de crescimento careceu de espectinomicina. Permitiu-se que as culturas de semente atingissem a saturação e foram, então, usadas para iniciar as culturas de 20-ml em tubos lacrados de 50-ml, usando as mesmas condições e meio de crescimento descritos acima. Os valores iniciais de OD₆₀₀ foram de cerca de 0,12 em todos os casos. As alíquotas das culturas (500-µL) foram colhidas durante a fase exponencial (OD₆₀₀ de cerca de 1,1) através de centrifugação (15000 x g, 10 minutos) e os *pellets* celulares foram resuspensores em 250 µL de tampão de amostra de 1X SDS-PAGE. Todos os reagentes para eletroforese foram obtidos a partir de Invitrogen. Um

milímetro de tampão de amostra 1X SDS-PAGE contém 250 µL de Tampão de Amostra de NuPAGE™ LDS 4X (Cat. Nº. N0007), 100 µL de Agente de Redução de Amostra de NuPAGE™ (Cat. Nº. NP0004) e 650 µL de água destilada. As amostras foram aquecidas por 10 minutos a 80°C e resíduos particulados foram removidos por centrifugação (15000 x g, 10 minutos). As alíquotas das amostras clarificadas (20 µL) foram, então, submetidas a SDS-PAGE, com o uso de 12% de gel Bis-Tris de NuPAGE™ (Cat. Nº. NP0341) e do protocolo de Tampão de Execução MES SDS de NuPAGE™ (Cat. Nº. NP0002) para as amostras reduzidas conforme recomendado pelo comerciante. O gel foi executado à temperatura ambiente em voltagem constante (180 V) por cerca de 1 hora e foi manchado com SimplyBlue SafeStain de Invitrogen (Cat. Nº. LC6060) conforme recomendado pelo fabricante.

[0183] A massa molecular da proteína RPI de *Z. mobilis* é de 16927,37 Da com base na sequência de DNA da fase de leitura aberta. Conforme na Figura 16, inúmeras bandas de proteína levemente manchadas migraram no gel de poliacrilamida nessa região (isto é, entre os padrões de peso molecular 17 kDa e 19 kDa) para a cepa parental, ZW1 (Pistas 2 e 7). A inspeção visual Do gel revelou que a intensidade de uma das bandas manchadas (indicada com uma seta) aumentou ao menos 2 vezes quando o plasmídeo de expressão de 641GAP-RPI foi introduzido em ZW1 (Pistas 3 e 5), indicando que essa é a proteína RPI. Adicionalmente, é perfeitamente evidente na Figura 12 que a intensidade da banda RPI de *Z. mobilis* aumentou muito mais drasticamente para as duas cepas que abrigaram o plasmídeo de expressão 801GAP- de (Pistas 4 e 6). Esses resultados fornecem uma evidência convincente de que o promotor 801GAP é um promotor mais forte do que o promotor 648GAP e que esse último é uma ferramenta útil para expressar genes estranhos em níveis muito altos.

EXEMPLO 10

**ATIVIDADE ENZIMÁTICA E COMPARAÇÃO DE SEQUÊNCIA DAS REGIÕES PROMOTORAS
DO TRANSGENE GAP DE CEPAS DE XILOSE INDEPENDENTEMENTE ADAPTADAS
UTILIZANDO *Z. MOBILIS***

[0184] Visto que a cepa 8b (Exemplo 1 e Pedido de patente publicado US 20030162271) foi obtida como uso de um curso similar de introdução de gene e adaptação de cepa como foi a ZW658, as atividades de transgene do trajeto de pentose fosfato e da sequência do operon *PgapxylAB* também foram comparadas em cepas adaptadas mais completa e parcialmente desta produção de cepa independente. As atividades enzimáticas para os produtos do operon *PgapxylAB* em uma cepa parcialmente adaptada 8XL4 e a cepa adaptada final 8b foram medidas com o uso de técnicas descritas em Métodos Gerais e os resultados expressos como $\mu\text{moles produto/mg proteína/minuto}$ são mostrados na Tabela 2

TABELA 2

**ATIVIDADES ENZIMÁTICAS EM DIFERENTES CEPAS DE *Z. MOBILIS* ADAPTADAS QUE
UTILIZAM XILOSE**

Cepa	Xilose isomerase	Xilulose quinase
8XL4	0,027+/- 0,004	1,10 +/- 0,41
8b	0,142 +/- 0,057	5,76 +/- 0,43

[0185] Assim como com a adaptação que ocorreu quando as cepas que precederam ZW658 obtiveram mutações que permitiram um crescimento melhorado em xilose, a cepa 8b teve a atividade aumentada para produtos de ambos os genes no operon *xylAB* em relação à sua cepa precedente 8XL4. Mais uma vez o aumento em atividade enzimática medida foi cerca de cinco vezes aumentado em relação à cepa menos adaptada.

[0186] A expressão de direcionamento do *Pgap* do operon *xylAB* foi sequenciada nas cepas 8b e 8XL4. Um fragmento de PCR foi preparado com o uso de um *primer* direto de PCR (GAP-F8; SEQ ID N°:39) a partir da terminação 5' do promotor e um *primer* reverso a partir da região codificadora de *xylA* (XylAB851R; SEQ ID N°:5). O produto PCR resultante foi sequenciado com o uso de dois *primers* GAP-F8, XylAB449R, e XylAB851R (SEQ ID N°s:39, 41, e 40). A sequência promotora a partir de ZW8XL4 é dada em SEQ ID N°:3 e aquela a partir de 8b em SEQ ID N°:5. Essas sequências promotoras também tinham, ambas, uma diferença com a sequência descrita do *Pgap* da cepa CP4 como o *Pgap* do operon *xylAB* em ZW641 e ZW658. Além dessas mudanças comuns havia, também, uma diferença de par de base única entre as sequências de *Pgap* em ZW641 e ZW658. Enquanto a mudança de G para T na -189 ao início ATG não se fez presente na comparação de 8XL4 e 8b, uma mudança de C para T ocorreu na posição -89 em relação ao início ATG.

[0187] Assim como ocorreu com a sequência promotora do operon *PgapxylAB* na cepa ZW658, a sequência promotora do operon *PgapxylAB* na cepa 8b mudou durante a adaptação para uma nova sequência que permitiu a produção de mais da proteína das regiões codificadoras mediante seu controle do que a sequência do mesmo promotor da cepa parcialmente adaptada.

REIVINDICAÇÕES

1. MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO, caracterizada pelo fato de que consiste em um promotor de gene de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Z. mobilis* compreendendo uma substituição de base em uma posição selecionada a partir do grupo que consiste de T substituindo G na posição 116, T substituindo C na posição 217, e em ambas T substituindo G na posição 116 e T substituindo C na posição 217; em que os números de posição são da SEQ ID Nº: 1, e em que o promotor resultante confere uma expressão gênica mais elevada.

2. MOLÉCULA, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que compreende uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID Nº: 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12.

3. GENE QUIMÉRICO, caracterizado pelo fato de que compreende a molécula de ácido nucleico, conforme definida na reivindicação 1, ligada operacionalmente a uma molécula de ácido nucleico heteróloga.

4. GENE, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a molécula de ácido nucleico heteróloga codifica uma proteína ou peptídeo.

5. GENE, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a molécula de ácido nucleico heteróloga codifica uma molécula de RNA regulatória selecionada a partir do grupo que consiste em um RNA antisenso, uma ribozima e um RNA de interferência.

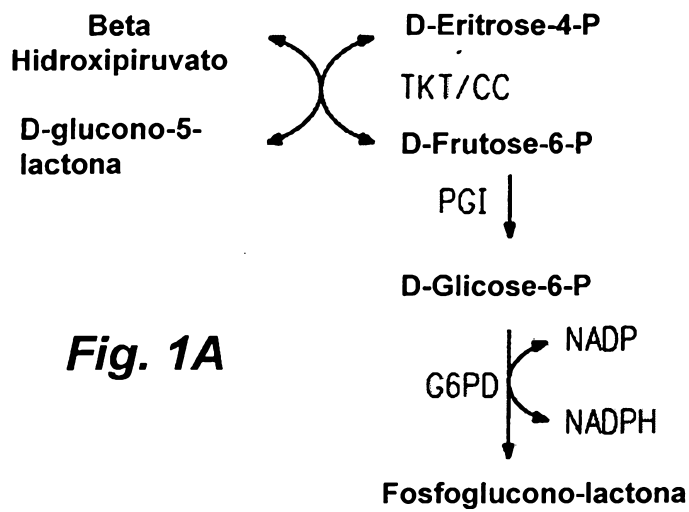
6. VETOR, caracterizado pelo fato de que compreende a molécula de ácido nucleico, conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 2.

7. MÉTODO DE TRANSFORMAÇÃO DE UMA CÉLULA BACTERIANA, selecionada a partir do grupo que consiste em células de *Zymomonas* e células de *Zymobacter*, caracterizado pelo fato de que

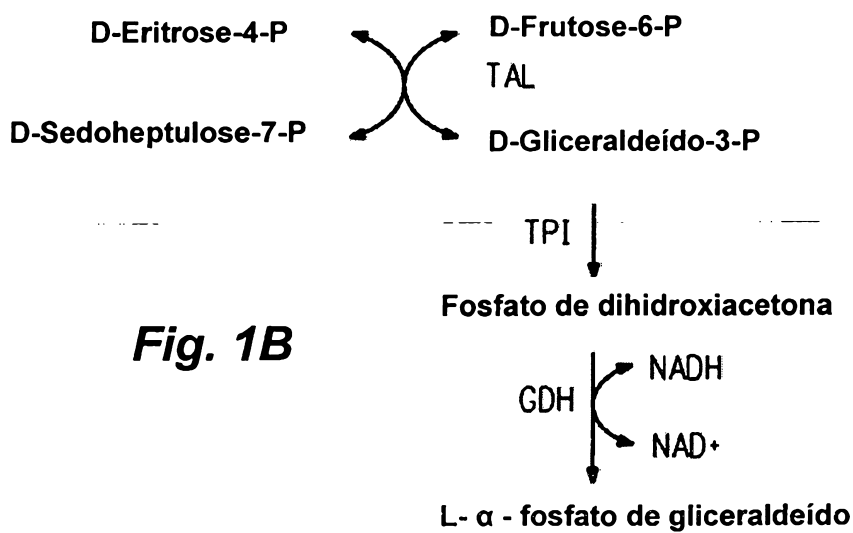
compreende introduzir na célula a molécula de ácido nucleico, conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 2.

8. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que a introdução compreende integrar a molécula de ácido nucleico, conforme definida na reivindicação 1, no genoma da célula ou mantê-la em um plasmídeo de replicação estável dentro da célula.

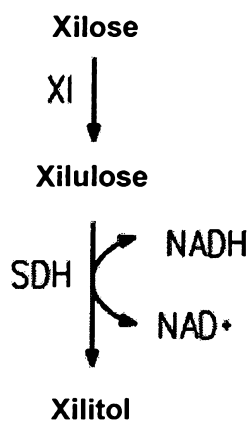
Ensaio de Transcetolase

**Fig. 1A**

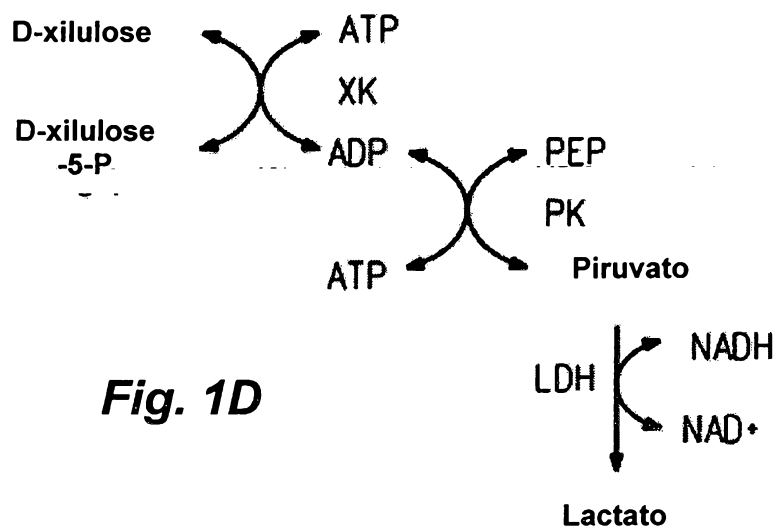
Ensaio de Transaldolase

**Fig. 1B**

Ensaio de Xilose Isomerase

Fig. 1C

Ensaio de Xiluloquinase



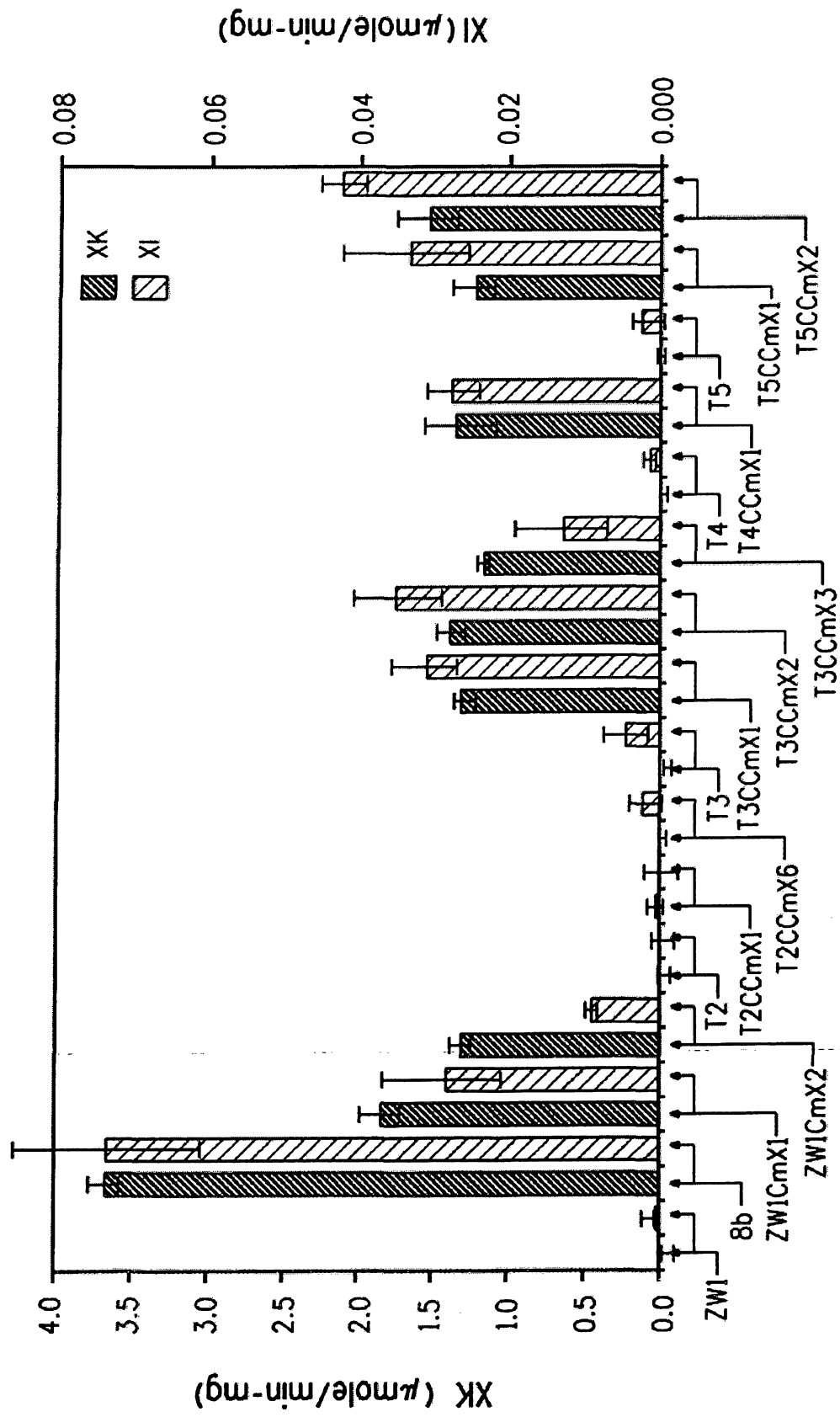


Fig. 2

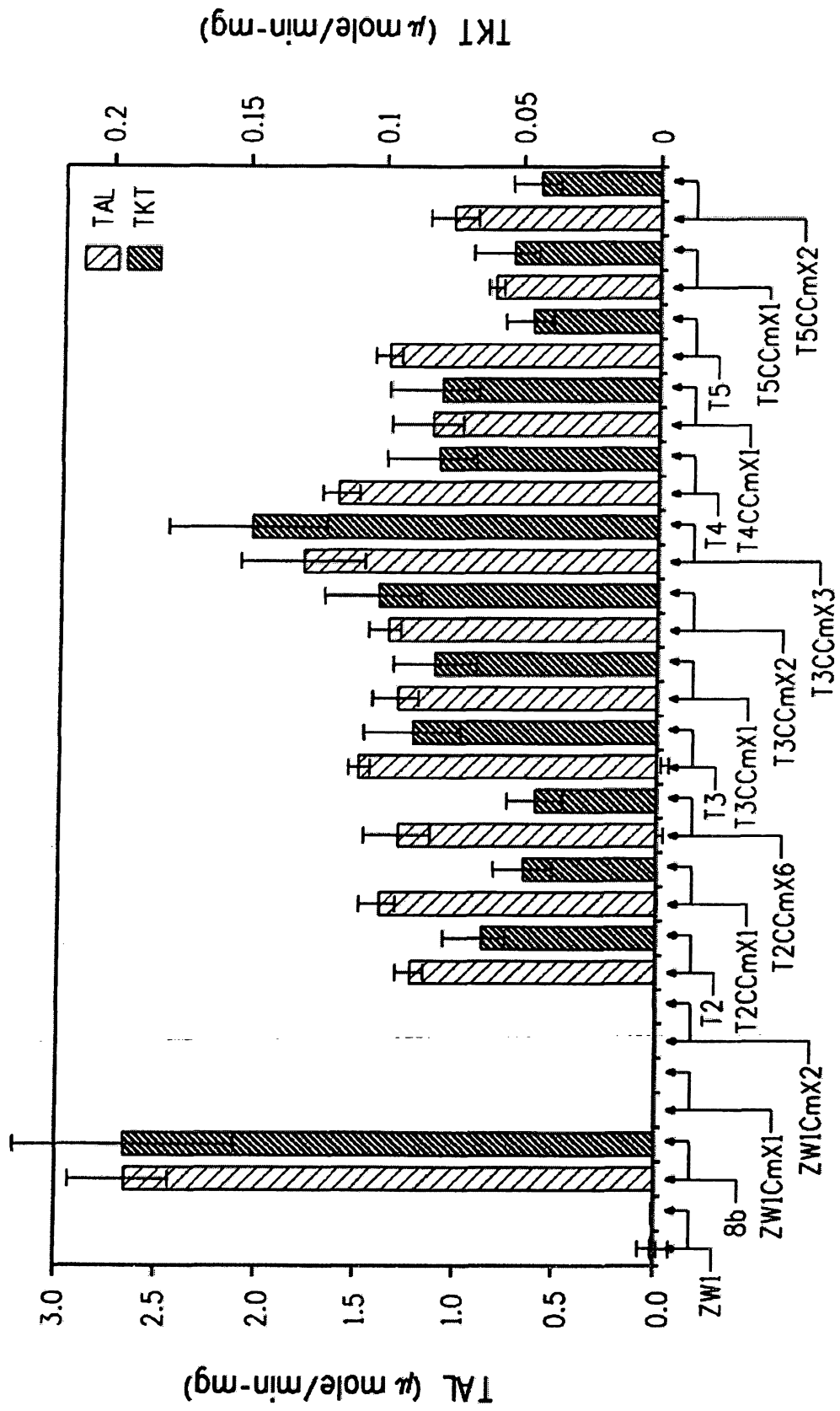


Fig. 3



Fig. 4

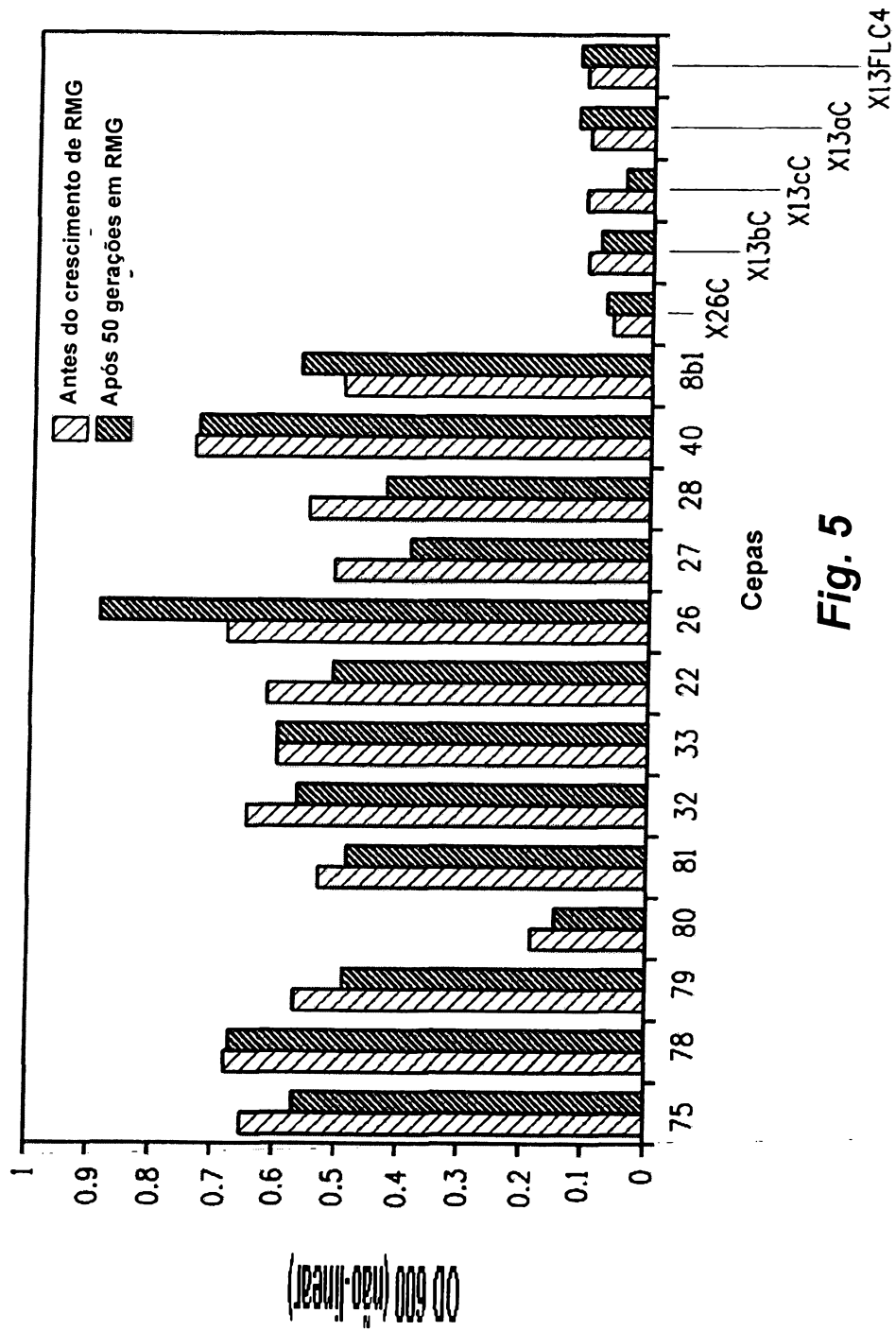
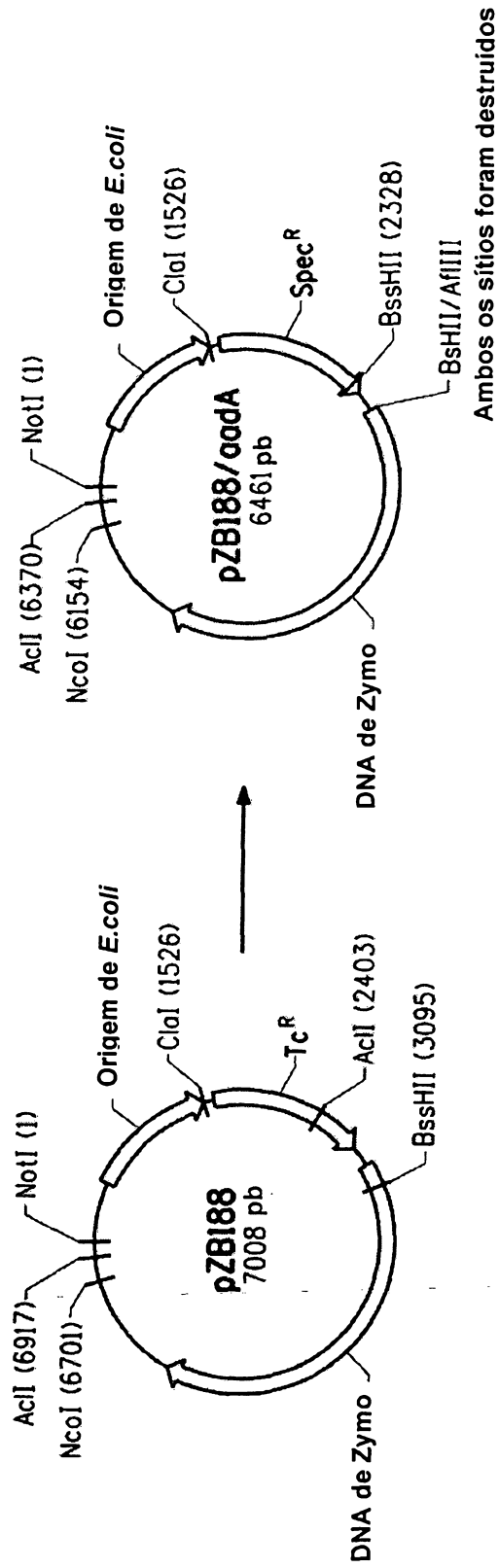


Fig. 5



Continua na
Fig. 6C

Continuação da

Fig. 6B

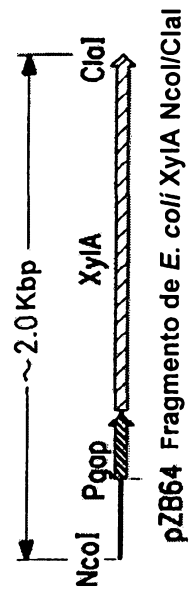
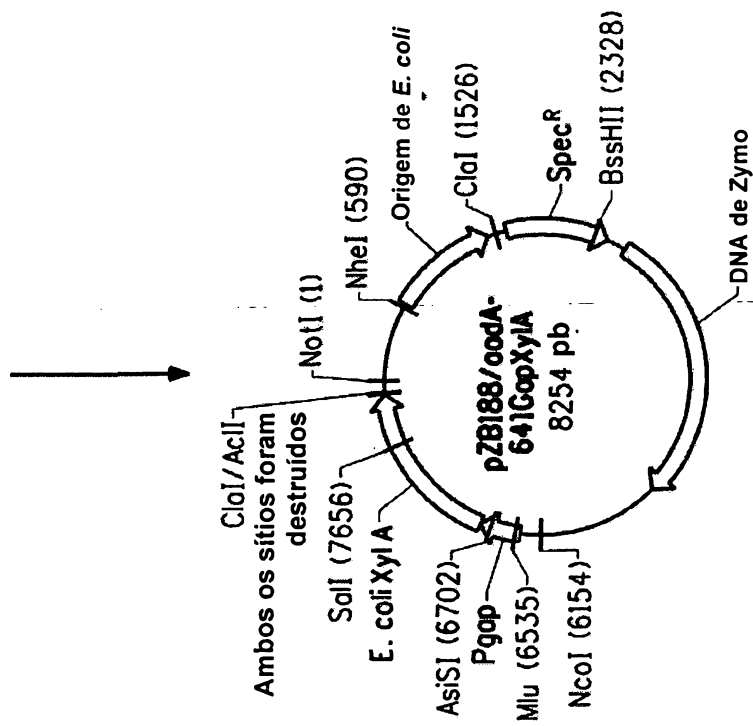


Fig. 6D

Fig. 6C

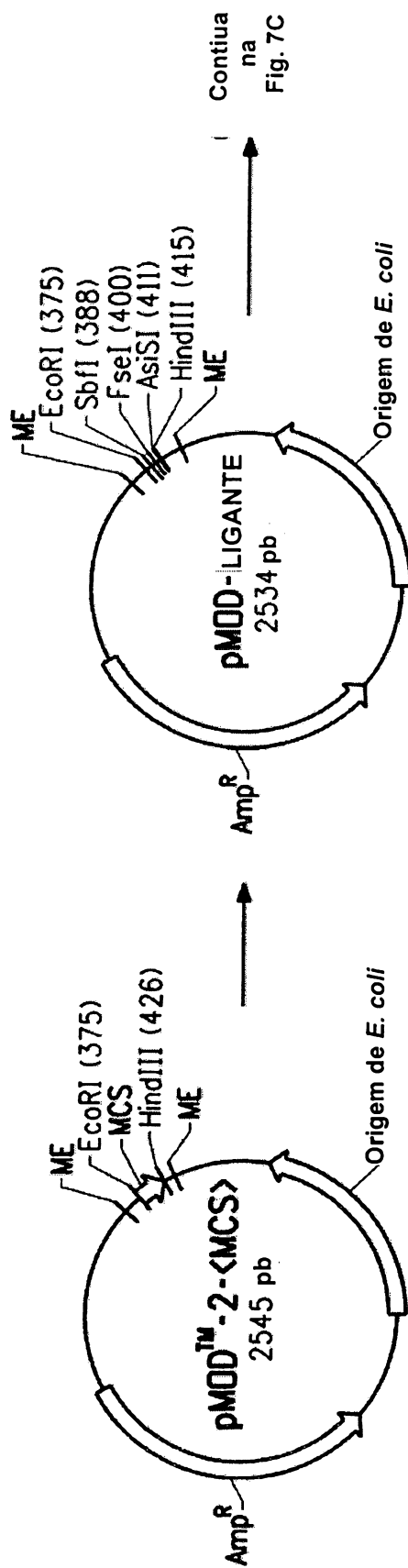


Fig.7A

Fig.7B

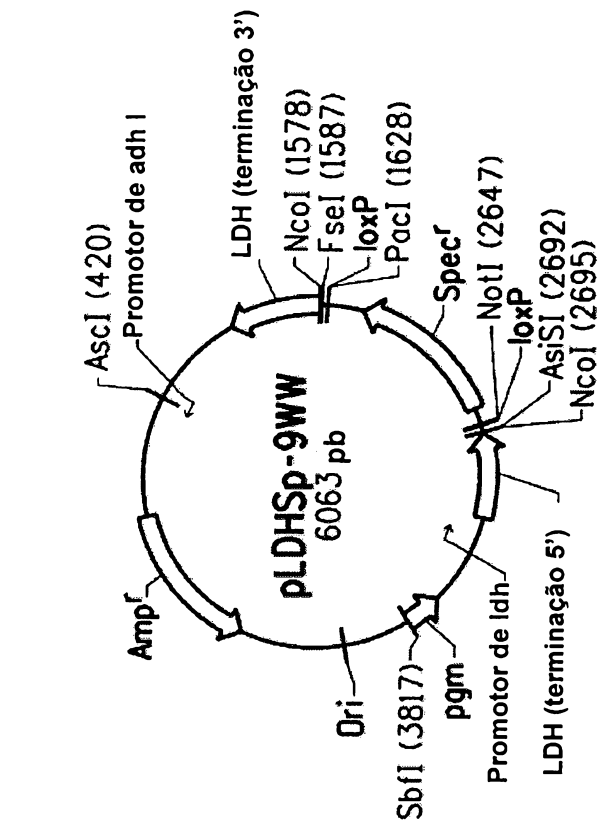


Fig.8

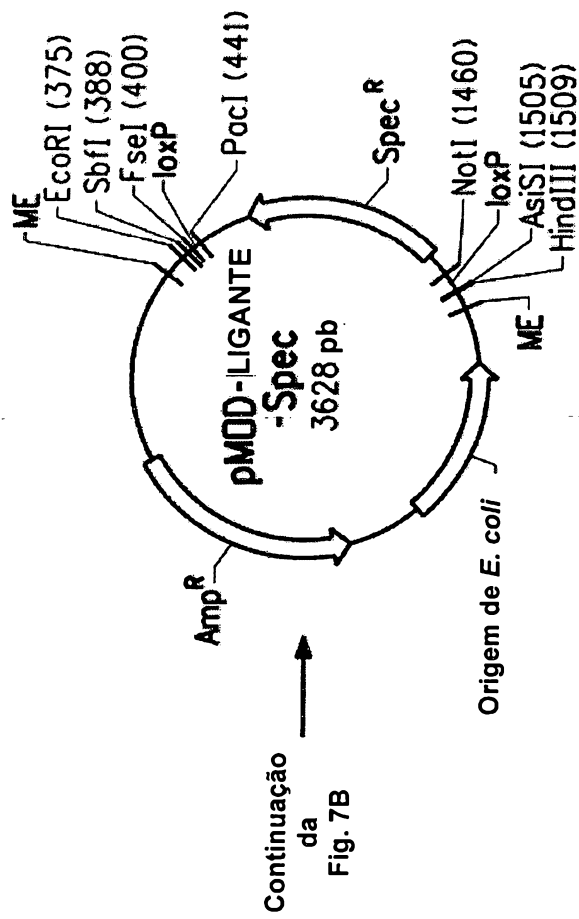
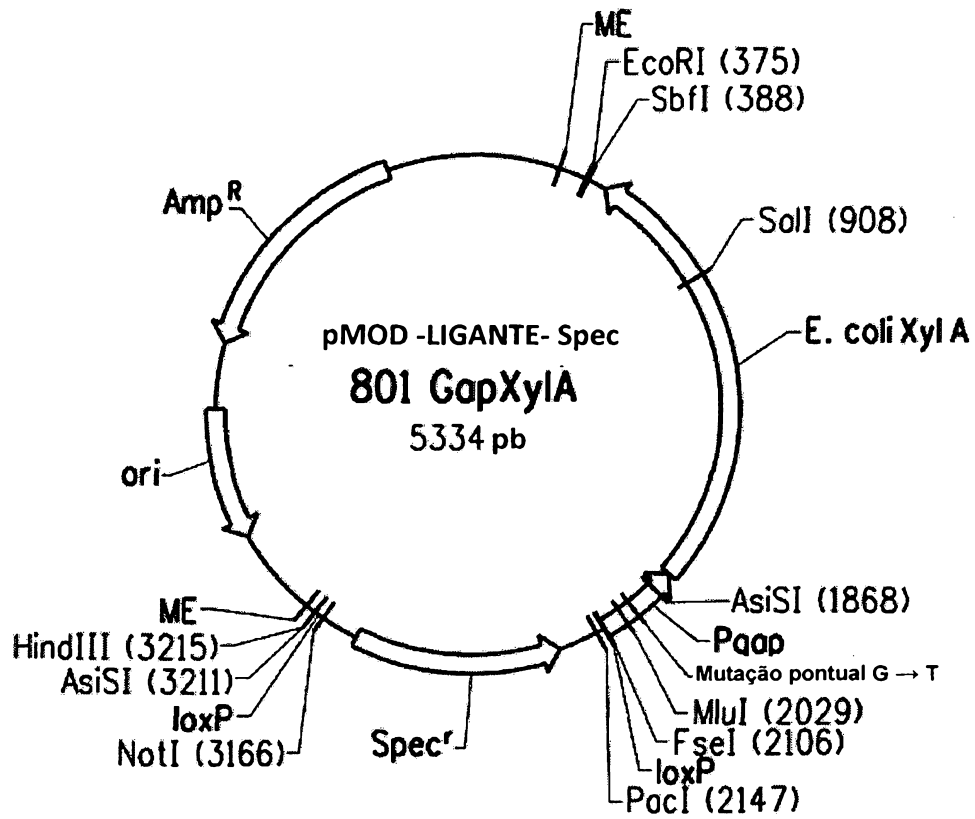
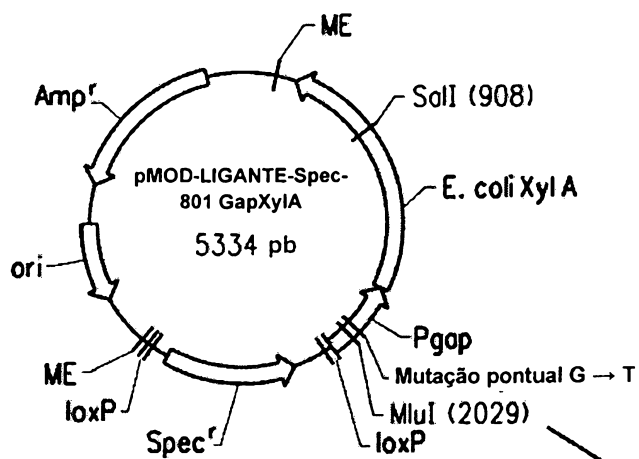
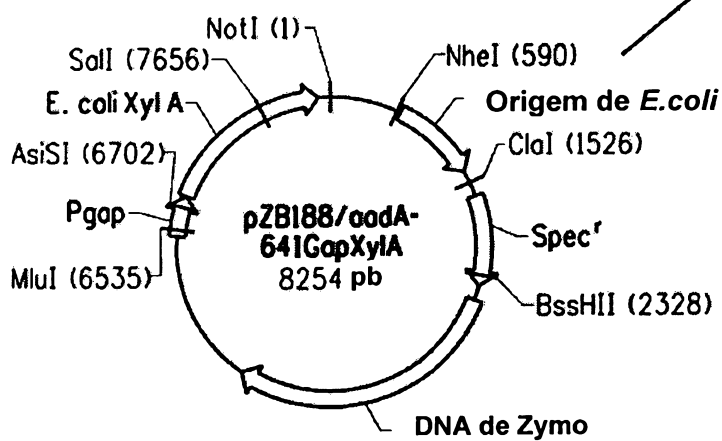


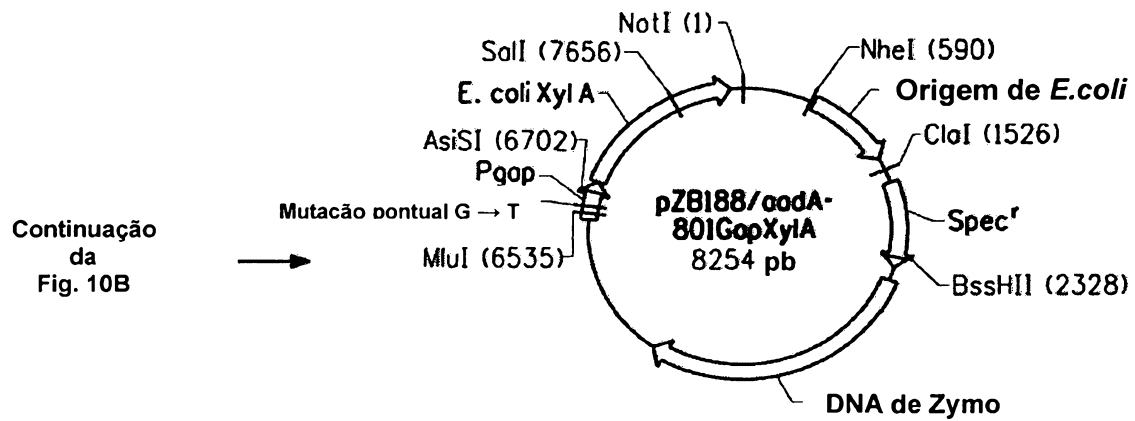
Fig.7C

**Fig. 9**

**Fig. 10A**

Continua
na
Fig. 10C

**Fig. 10B**

**Fig. 10C**

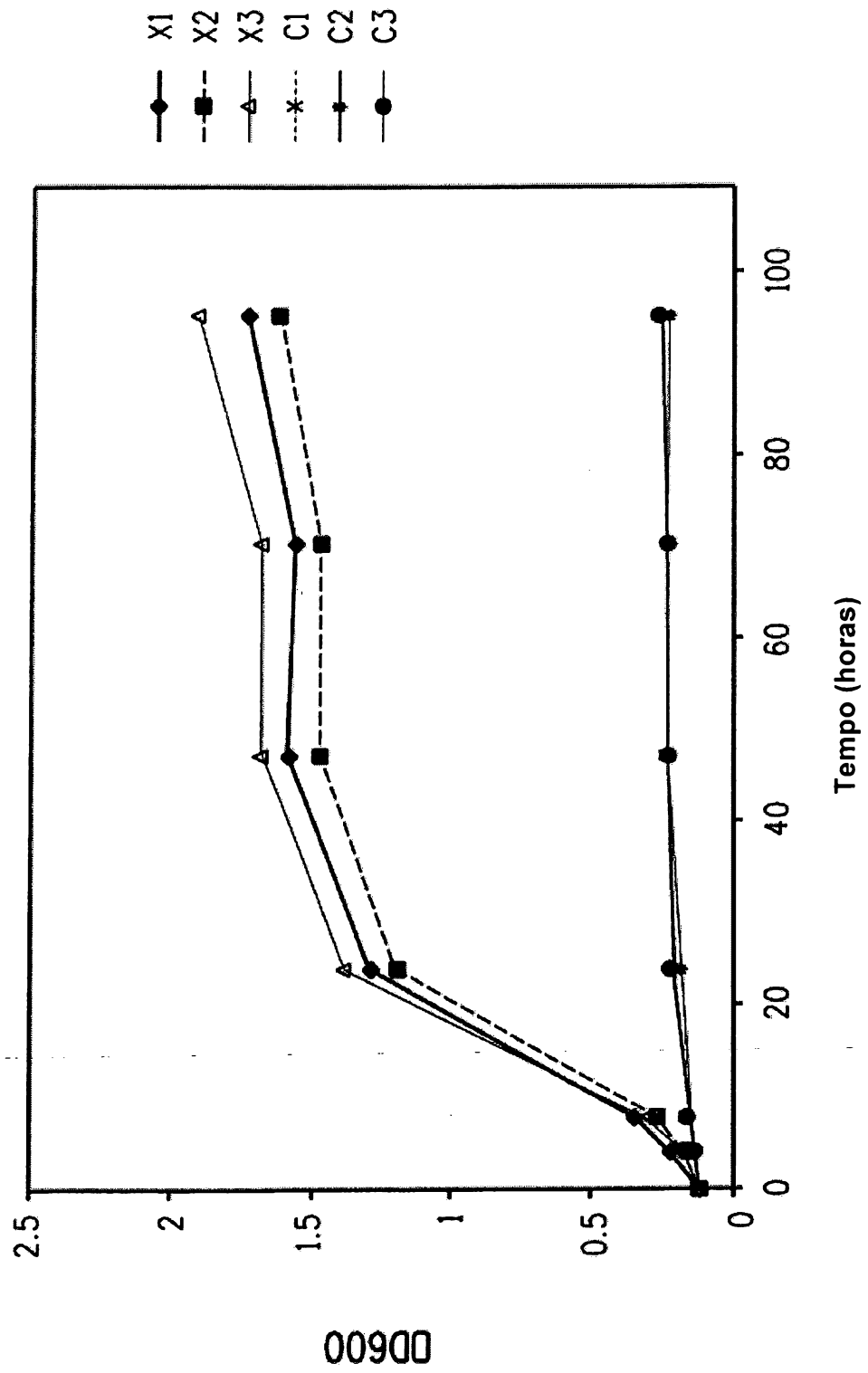
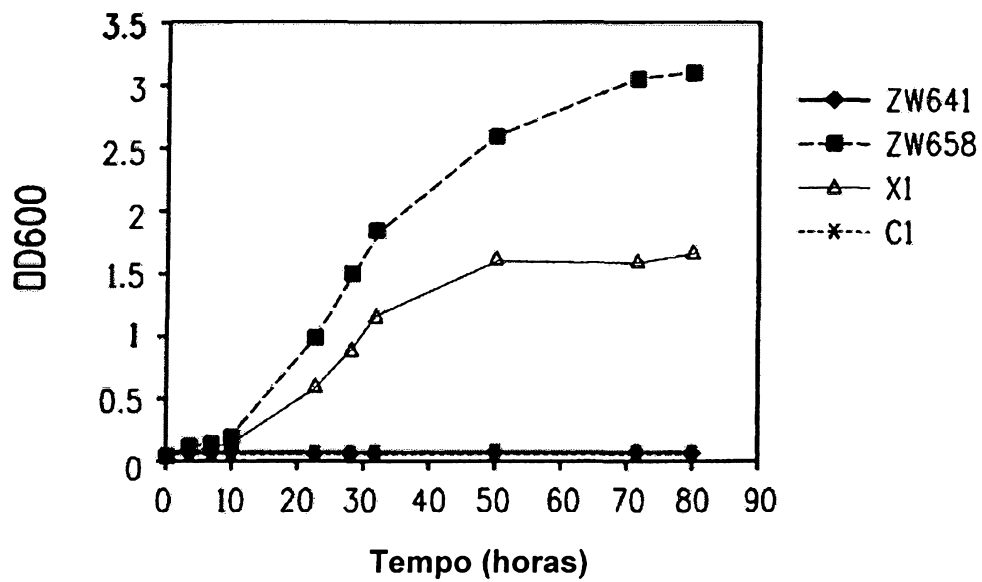
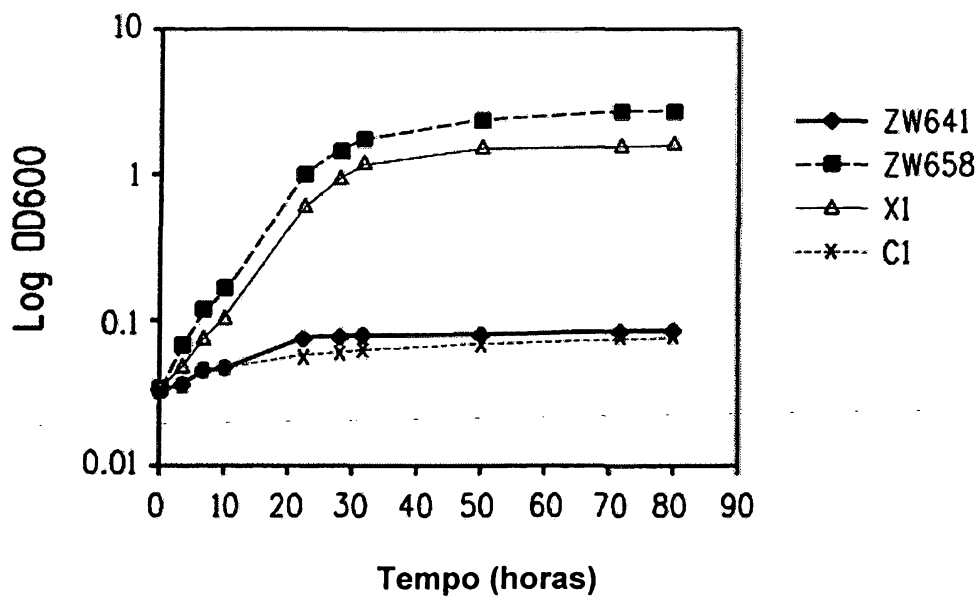
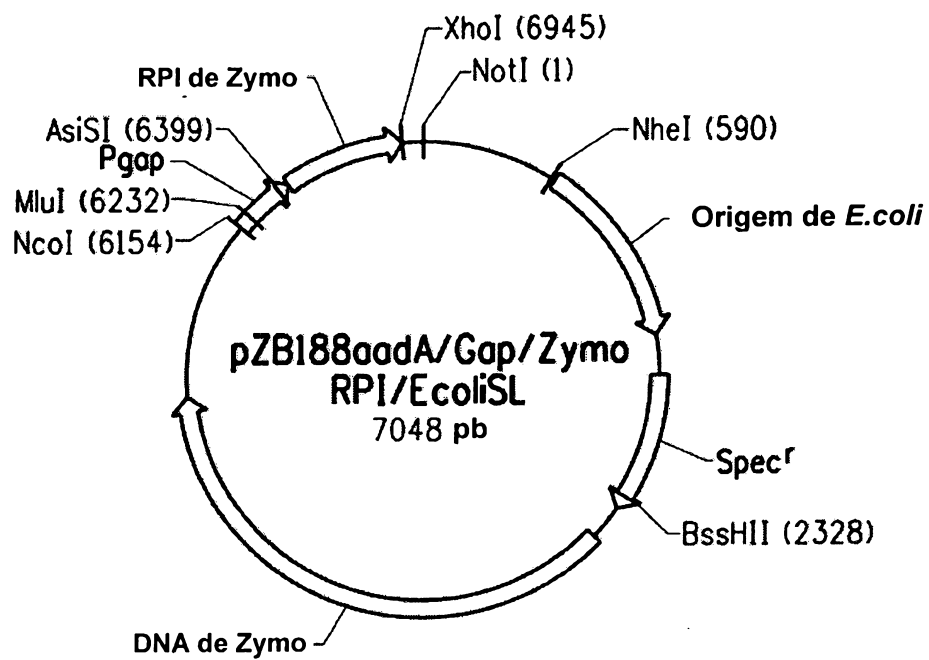
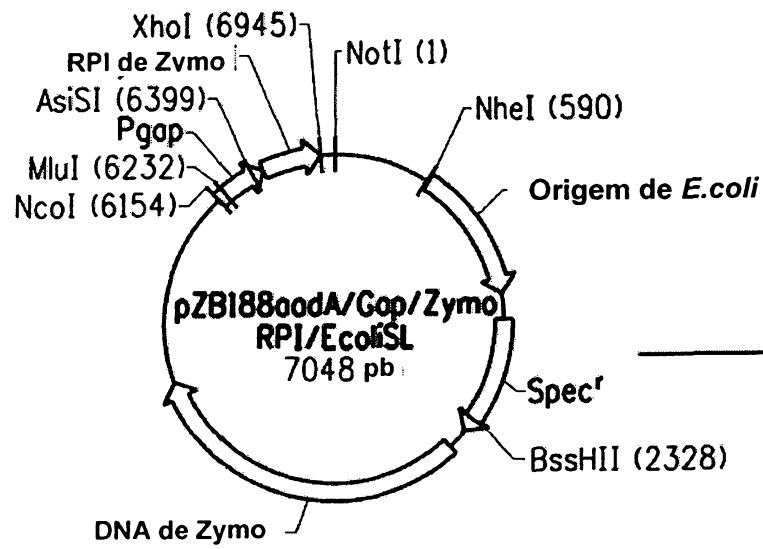


Fig.11

**Fig. 12A****Fig. 12B**

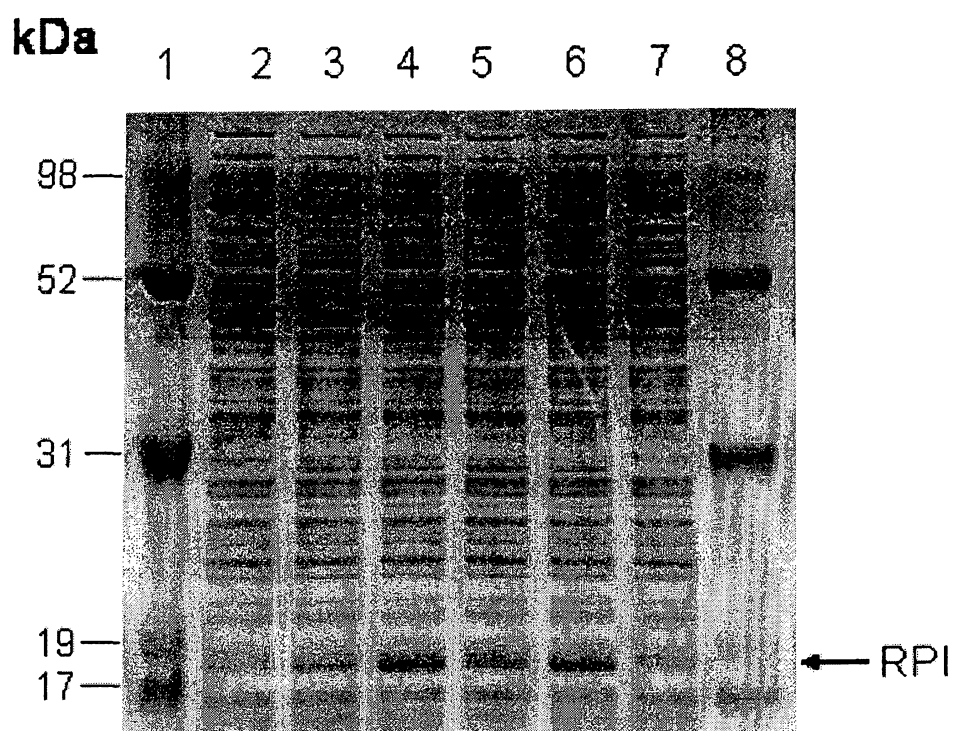
**Fig.14**



Continua
na
Fig. 15 B

Continua
na
Fig. 15 C

Fig.15 A



1: Marcadores MW

2: ZW1

3: 641gapRpi #1

4: 801gapRpi #1

5: 641gapRpi #2

6: 801gapRpi #2

7: ZW1

8: Marcadores MW

Fig.16