

* R R P T O 8 0 8 9 Z 2 A 2 *

(51) Int.Cl.:
C12P 7/18
C12N 1/21
C12N 9/90

(57) Resumo:

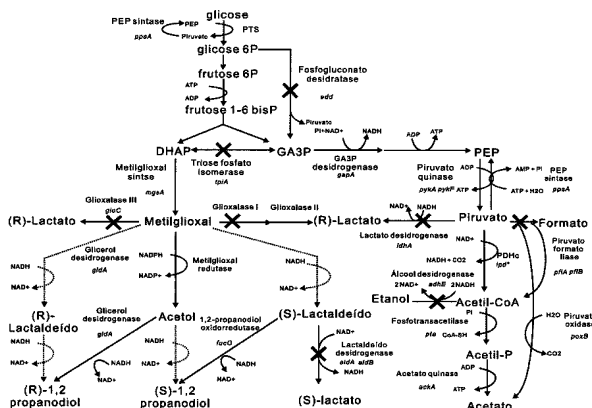
(73) Titular(es): Metabolic Explorer

(72) Inventor(es): François Voelker, Philippe Soucaille, Rainer Figge

(74) Procurador(es): Di Blasi, Parente, Vaz e Dias & Al.

(86) Pedido Internacional: PCT EP2008053445 de 21/03/2008

(87) Publicação Internacional: WO 2008/116852de
02/10/2008



Relatório Descrito da Patente de Invenção para: **"NOVOS MICROORGANISMOS PARA A PRODUÇÃO DE 1,2-PROPANODIOL OBTIDOS ATRAVÉS DE UMA COMBINAÇÃO DE EVOLUÇÃO E DESIGN RACIONAL"**

A presente invenção se refere a um novo método
5 combinando evolução e design racional para o preparo de um microorganismo para produzir 1,2-propanodiol, o microorganismo desse modo obtido e seu uso para o preparo de 1,2-propanodiol.

O 1,2-propanodiol ou propileno glicol, um C₃ diálcool,
10 é um produto químico amplamente usado. Ele é um componente de resinas de poliéster insaturado, detergentes líquidos, refrigerantes, fluidos anti-congelamento e de descongelamento para aeronaves. O propileno glicol tem sido usado crescentemente desde 1993-1994 como um substituto
15 para derivados de etileno, os quais são reconhecidos como sendo mais tóxicos do que derivados de propileno.

O 1,2-propanodiol é atualmente produzido através de meios químicos usando um processo de hidratação de óxido de propileno que consome grandes quantidades de água. Óxido de propileno pode ser produzido através de qualquer de dois
20 processos, um usando epicloroidrina e o outro hidroperóxido. Ambas as vias usam substâncias altamente tóxicas. Além disso, a via com hidroperóxido gera subprodutos, tais como terc-butanol e 1-fenil etanol. Para

que a produção de propileno seja proveitosa, deve ser encontrado um uso para esses subprodutos. A via química geralmente produz 1,2-propanodiol racêmico, enquanto que cada um dos dois estereoisômeros, (*R*)1,2-propanodiol e
5 (*S*)1,2-propanodiol, são de interesse para determinadas aplicações (por exemplo, materiais de partida quirais para produtos químicos e produtos farmacêuticos especiais).

As desvantagens dos processos químicos para a produção de 1,2-propanodiol tornam a síntese biológica uma
10 alternativa atraente. Duas vias foram caracterizadas para a produção natural de 1,2-propanodiol a partir de açúcares por meio de microorganismos.

Na primeira via, 6-deóxi açúcares (por exemplo, L-ramnose ou L-fucose) são clivados em fosfato de
15 dihidroxiacetona e (*S*)-lactaldeído, o qual pode ser ainda reduzido em (*S*)-1,2-propanodiol (Badia e colaboradores, 1985). Essa via é funcional em *E. coli*, mas pode não proporcionar um processo economicamente possível em virtude do custo elevado das deóxi-hexoses.

20 A segunda via é o metabolismo de açúcares comuns (por exemplo, glicose ou xilose) através da via de glicólise, seguido pela via de metilglioxal. Fosfato de dihidroxiacetona é convertido em metilglioxal, que pode ser reduzido em lactaldeído ou em acetol. Esses dois compostos

podem, então, sofrer uma segunda reação de redução que proporciona 1,2-propanodiol. Essa via é usada por produtores naturais de (R)-1,2-propanodiol, tais como *Clostridium sphenoides* e *Thermoanaerobacter*
5 *thermosaccharolyticum*. *Clostridium sphenoides* tem sido usado para produzir 1,2-propanodiol em uma titulação de 1,58 g/l sob condições com fosfato limitado (Tran Din e Gottschalk, 1985). *Thermoanaerobacter thermosaccharolyticum* também foi investigado para a produção de 1,2-propanodiol
10 (Cameron e Cooney, 1986, Sanchez-Rivera e colaboradores, 1987). Os melhores desempenhos obtidos foram uma titulação de 9 g/l e um rendimento, a partir de glicose, de 0,2 g/g. Contudo, o aprimoramento dos desempenhos obtidos com esses organismos provavelmente é limitado em virtude da escassez
15 de ferramentas genéticas disponíveis.

TÉCNICA ANTERIOR

Cameron e colaboradores (1998) investigaram o uso de *E. coli* como uma plataforma de engenharia metabólica para a conversão de açúcares em 1,2-propanodiol. Sua análise
20 teórica mostrou que o limite máximo do rendimento de produto realístico (considerando-se os equilíbrios de massa e produção de energia para crescimento) é significativamente diferente, dependendo das condições de

cultura. Sob condições anaeróbicas, acetato será produzido como um subproduto de forma a reciclar os co-fatores reduzidos e o melhor rendimento estará limitado a 1 mol de 1,2-propanodiol por mol de glicose (0,42 g/g). Sob

5 condições aeróbicas, reciclagem de co-fatores será assegurada pela cadeia respiratória usando oxigênio como um receptor de elétrons terminal e se tornaria possível produzir 1,2-propanodiol sem a produção de subprodutos. Sob essas condições, o rendimento poderia atingir no máximo

10 1,42 moles/mol (0,6 g/g). Considerando a titulação máxima de 1,2-propanodiol, Cameron e colaboradores discutiram sua dependência da toxicidade de produto e subproduto. O 1,2-propanodiol é significativamente menos tóxico do que o 1,3-propanodiol e *E. coli* exibe uma taxa de crescimento

15 residual de $0,5 \text{ h}^{-1}$, com 100 g/l de 1,2-propanodiol. A inibição de crescimento é, mais provavelmente, em virtude do subproduto acetato, que é conhecido por ser altamente inibidor do crescimento. O desenvolvimento de um processo anaeróbico para a produção de 1,2-propanodiol com altas

20 titulações e rendimentos teria de levar em conta o problema com o acetato. A conversão de acetato em acetona, a qual é menos inibitória e facilmente removida *in situ*, foi proposta (WO 2005/073364).

Várias investigações para modificações genéticas de *E.*

coli foram feitas pelo grupo de Cameron (Cameron e colaboradores, 1998, Altaras e Cameron, 1999, Altaras e Cameron, 2000) e pelo grupo de Bennett (Huang e colaboradores, 1999, Berrios-Rivera e colaboradores, 2003), de forma a obter um produtor de 1,2-propanodiol usando fontes de carbono simples. Esses estudos contam, por um lado, com a expressão de uma ou várias atividades enzimáticas na via a partir de fosfato de dihidroxiacetona em 1,2-propanodiol e, por outro lado, com a remoção de NADH e vias que consomem oxigênio na cepa hospedeira. Os melhores resultados obtidos pelo grupo de Cameron são produção de 1,4 g/l de 1,2-propanodiol em um frasco de cultura anaeróbico com um rendimento de 0,2 g/g de glicose consumida. Quando extrapolada para um fermentador com alimentação em batelada, a produção foi de 4,5 g/l de 1,2-propanodiol com um rendimento de 0,19 g/g a partir de glicose, no que diz respeito à avaliação teórica de Cameron e colaboradores. Esses desempenhos foram obtidos com a superexpressão do gene de sintase de metilglioxal de *E. coli* (*mgs*), o gene de dehidrogenase de glicerol de *E. coli* (*gldA*) e o gene de óxido-reductase de 1,2-propanodiol de *E. coli* (*fucO*) em uma cepa carecendo do gene que codifica dehidrogenase de lactato (*ldhA*). Os resultados obtidos com a mesma abordagem, mas com menores titulações e

rendimentos, também são descritos nas patentes US 6.087.140, US 6.303.352 e WO 98/37204.

O grupo de Bennett também usou uma cepa hospedeira de *E. coli* carecendo de *ldhA* para a superexpressão do gene *mgs* de *Clostridium acetobutylicum* e o gene *gldA* de *E. coli*.
5 Culturas em frasco, sob condições anaeróbicas, proporcionaram uma titulação de 1,3 g/l e um rendimento de 0,12 g/g, enquanto que culturas microaeróbicas proporcionaram uma titulação de 1,2 g/l com um rendimento
10 de 0,13 g/g.

Um método alternativo para obter uma cepa que produz 1,2-propanodiol é dirigir a evolução de uma "cepa inicial" a um estado onde a "cepa evoluída" produz o composto desejado com melhores características. Esse método é
15 baseado na evolução estrutural de um microorganismo o qual é primeiro modificado através de atenuação de dois genes, *tpiA* e um gene envolvido na conversão de metilglicoxal em lactato. A finalidade de atenuação do gene *tpiA* que codifica a isomerase de fosfato de triose é separar os dois
20 ramos metabólicos começando no gliceraldeído-3-fosfato (GA3P) e fosfato de dihidróxiacetona (DHAP) que são normalmente interconvertidos por essa enzima. A via de DHPA em 1,2-propanodiol será o "ramo de redução" que consome cofatores (NADH) reduzidos, enquanto que o metabolismo a

partir de GA3P em acetato será o "ramo oxidativo" que produz NADH e energia para o crescimento da célula. Sem um gene *tpiA* funcional, o metabolismo da célula é "travado" e o crescimento da cepa, a produção de 1,2-propanodiol e a produção de acetato estão intimamente associados. Sob pressão de seleção em um meio crescimento apropriado, essa cepa inicial evoluirá para um estado onde a produção de 1,2-propanodiol pela referida cepa é aprimorada. Esse procedimento para obter uma "cepa evoluída" de microorganismo para a produção de 1,2-propanodiol é descrito no pedido de patente WO 2005/073364. Esse processo de evolução e a etapa seguinte de fermentação são, de preferência, realizadas sob condições anaeróbicas. Essa tecnologia é um aprimoramento evidente com relação à técnica anterior. Uma titulação de 1,2-propanodiol de 1,8 g/l foi obtida, com um rendimento de 0,35 gramas por glicose consumida, próximo do resultado teórico de Cameron e colaboradores.

O objetivo da presente invenção é o aprimoramento de uma cepa produtora de 1,2-propanodiol através de evolução e subsequente engenharia genética racional da cepa evoluída. Uma característica especial é a reconstrução de um gene *tpiA* funcional na cepa *tpiA* menos evoluída. Essas modificações levam a uma produção aprimorada de 1,2-

propanodiol.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

A presente invenção se refere a um novo método combinando evolução e design racional para o preparo de uma
5 cepa de microorganismo para a produção de 1,2-propanodiol a partir de uma fonte de carbono. O referido método compreende:

- crescimento de uma cepa inicial sob pressão de seleção em um meio de crescimento apropriado, a referida
10 cepa bacteriana inicial compreendendo uma atenuação da expressão do gene *tpiA* e uma atenuação da expressão de pelo menos um gene envolvido na conversão de metilglioal em lactato (tal como *gloA*, *aldA*, *aldB*), de forma a promover a evolução na referida cepa inicial,

15 - então, seleção e isolamento da cepa evoluída tendo uma taxa de produção de 1,2-propanodiol aumentada (aumentada em pelo menos 20%),

- então, reconstrução de um gene *tpiA* funcional na cepa evoluída.

20 Em um aspecto da invenção, a síntese de subprodutos indesejados é atenuada através de deleção dos genes que codificam enzimas envolvidas na síntese de lactato a partir de piruvato (*IdhA*), formato (*pflA*, *pflB*), etanol (*adhE*). Em outro aspecto da invenção, a via de Entner-Doudoroff é

eliminada através de deleção do gene *edd* ou *eda* ou ambos. Vantajosamente, de forma a tornar mais NADH disponível para as etapas de redução na via biossintética de 1,2-propanodiol, pelo menos um gene selecionado dentre *arcA* e
5 *ndh* é atenuado.

O microorganismo usado para o preparo de 1,2-propanodiol é selecionado dentre bactérias, leveduras e fungos mas, de preferência, é da espécie *Escherichia coli* ou *Clostridium acetobutylicum*.

10 A presente invenção também se refere à cepa evoluída tal como obtido que pode ser, além disso, geneticamente modificada de forma a aperfeiçoar a conversão de uma fonte de carbono em 1,2-propanodiol sem subprodutos e com o melhor rendimento possível. Em um aspecto da invenção, a
15 atividade de desidrogenase de gliceraldeído-3-fosfato é reduzida de forma a redirecionar uma parte do gliceraldeído-3-fosfato disponível para a síntese de 1,2-propanodiol. Em um aspecto da invenção, a eficiência da importação de açúcar é aumentada usando uma importação de
20 açúcar independente de fosfoenol piruvato (PEP), tal como aquela codificada por *galP* ou fornecendo mais PEP ao sistema de açúcar-fosfotransferase. Isso é obtido eliminando as vias que consomem PEP, tais como quinases de piruvatos (codificadas pelos genes *pykA* e *pykF*) e/ou

promovendo a síntese de PEP, por exemplo, através de superexpressão do gene *ppsA* que codifica a sintase de PEP. Adicionalmente, é valioso se a enzima de conversão de piruvato em acetil-CoA for resistente à altas concentrações de NADH encontradas sob condições anaeróbicas. Isso pode ser obtido através de uma mutação específica no gene *lpd*. Vantajosamente, a síntese do subproduto acetato é impedida atenuando um ou vários dos genes *ackA*, *pta*, *poxB*.

A presente invenção também se refere a um método para a produção de 1,2-propanodiol em um ótimo rendimento, sob condições aeróbicas, microaeróbicas ou anaeróbicas, usando a referida cepa de *E. coli* evoluída e opcionalmente modificada geneticamente crescida em um meio de crescimento apropriado contendo uma fonte de carbono simples. Adicionalmente, a invenção se refere a um método para a produção de 1,2-propanodiol em um ótimo rendimento, sob condições anaeróbicas, usando a referida cepa de *C. acetobutylicum* evoluída e opcionalmente modificada geneticamente crescida em um meio de crescimento apropriado contendo uma fonte de carbono simples ou complexa. O 1,2-propanodiol produzido de acordo com esse método é subsequenteemente recuperado e opcionalmente purificado.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

O desenho anexado, que é incorporado e constitui uma

parte do presente relatório descritivo, exemplifica a invenção e, junto com a descrição, serve para explicar os princípios da presente invenção.

A Figura 1 representa a engenharia genética do metabolismo central no desenvolvimento de um sistema de produção de 1,2-propanodiol a partir de carboidratos.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Conforme aqui utilizado, os termos a seguir podem ser usados para interpretação das reivindicações e relatório descritivo.

O termo "cepa" denota uma variante genética de uma espécie. Assim, o termo "cepa de microorganismo" denota uma variante genética de uma espécie de um microorganismo específico. As características fornecidas para qualquer cepa também se aplicam para qualquer microorganismo correspondente ou vice-versa.

De acordo com a invenção, os termos "cultura", "crescimento" e "fermentação" são usados de maneira intercambiável para denotar o crescimento de bactérias em um meio de crescimento apropriado contendo uma fonte de carbono simples.

O termo "fonte de carbono", de acordo com a presente invenção, denota qualquer fonte de carbono que pode ser usada por aqueles habilitados na técnica para sustentar o

crescimento normal de um microorganismo e que pode ser hexoses, pentoses, monossacarídeos, dissacarídeos, oligossacarídeos, amido ou seus derivados, hemiceluloses, glicerol e combinações dos mesmos.

5 O termo "meio de crescimento apropriado", de acordo com a invenção, denota um meio de composição molecular conhecida adaptado ao crescimento do microorganismo e projetado de modo que ele promova a evolução desejada.

O processo de evolução de acordo com a invenção é um
10 processo para o preparo de microorganismos evoluídos apresentando características de produção aprimoradas e compreende as seguintes etapas:

a) modificação de um microorganismo para obter uma cepa inicial com um metabolismo "travado", onde a evolução
15 pode ocorrer apenas na direção desejada quando as células da cepa inicial são crescidas sobre um meio apropriado,

b) crescimento da cepa inicial obtida acima sobre o referido meio de forma a fazer com que a mesma evolua, em que a cepa inicial é crescida sob condições aeróbicas,
20 microaeróbicas ou anaeróbicas,

c) seleção das "cepas evoluídas" capazes de crescer sob essas condições específicas, apresentando características de produção aprimoradas para o composto desejado.

Esse processo de evolução foi extensivamente descrito nos pedidos de patente WO 2004/076659 depositado em 17/02/2004 e WO 2005/073364 depositado em 12/01/2005, pelos mesmos requerentes.

5 O termo "seleção", de acordo com a invenção, denota um processo em que as únicas cepas de microorganismos que são retidas no meio de cultura são aquelas que apresentam uma melhor adaptação sob as condições de pressão de seleção. Tipicamente, as cepas mais adaptadas crescem mais do que
10 seus competidores e são, então, selecionadas. Uma forma simples de selecionar uma cepa de microorganismo evoluída específica em uma população consiste em crescimento da população em cultura contínua na qual as cepas de crescimento lento são eventualmente eluídas da cultura.
15 Esse não é um exemplo exclusivo para seleção e outros métodos de seleção conhecidos pelo técnico no assunto podem ser aplicados.

 O termo "isolamento" denota um processo onde uma cepa individual que apresenta modificações genéticas específicas
20 é separada de uma população de cepas que apresenta características genéticas diferentes. Isso é feito através de amostragem da biomassa após o período de evolução e disseminação da mesma sobre placas de Petri para isolar colônias únicas.

O termo "taxa de produção de 1,2-propanodiol" significa uma taxa de produção expressa em g/l/h, que é calculada como segue:

$$\frac{\text{Concentração de 1,2-propanodiol produzido no meio (g/l)}}{\text{tempo necessário para essa produção (hora)}}$$

Adicionalmente, uma taxa de produção específica expressa em g/g/h, levando-se em conta a quantidade de biomassa, pode ser calculada como segue:

$$\frac{\text{Concentração de 1,2-propanodiol produzido no meio (g/l)}}{\frac{\text{concentração de biomassa produzida no meio (g/l)}}{\text{tempo necessário para essas produções (h)}}}$$

A concentração de biomassa é determinada medindo a absorbância do caldo de fermentação com uma leitura em espectrofotômetro, por exemplo, a 600 nm ou determinando o peso seco das células após secagem de um volume definido de caldo de fermentação.

A quantidade de 1,2-propanodiol produzido é medida através de cromatografia de líquido de alto desempenho (HPLC) com uma coluna adaptada de acordo com um estado do protocolo na técnica.

Na presente invenção, cepas evoluídas são selecionadas com relação às seguintes características: uma taxa de captação de glicose aumentada e uma taxa de produção de 1,2-propanodiol aprimorada. As cepas mostrando essas

características são, então, isoladas e, vantajosamente, comparadas umas com as outras, de forma a identificar o melhor produtor.

A taxa de captação de glicose, expressa em g/l/h, é calculada como segue:

$$\frac{\text{Concentração de glicose consumida pela cultura (g/l)}}{\text{tempo necessário para esse consumo (h)}}$$

Uma taxa de captação de glicose específica pode ser calculada levando-se em conta a concentração de biomassa no meio, conforme previamente descrito.

A taxa de captação de glicose e taxa de produção de 1,2-propanodiol são intimamente relacionadas. Se o consumo de glicose é aumentado, a produção dos produtos a partir do metabolismo de glicose é aumentada na mesma proporção.

Após seleção e isolamento, as cepas melhor evoluídas apresentam uma captação de glicose que é cerca de 20% maior do que a captação da cepa inicial, de preferência cerca de 30% maior ou mais, mais preferivelmente 50% maior.

A taxa de produção de 1,2-propanodiol aumentada é cerca de 20% maior do que a taxa de produção da cepa inicial, de preferência cerca de 30% maior ou mais, mais preferivelmente cerca de 50% maior.

O gene *tpiA* codifica a enzima "isomerase de fosfato de triose", a qual catalisa a interconversão de DHAP e GA3P

(ver Figura 1). A finalidade da atenuação desse gene é manipular o metabolismo da célula de uma forma tal que a evolução à produção mais eficiente de 1,2-propanodiol se torna possível.

5 O termo "atenuação da expressão de um gene", de acordo com a invenção, denota a supressão parcial ou completa da expressão de um gene o qual é, então, dito como sendo "atenuado". Essa supressão de expressão pode ser uma inibição da expressão do gene, a supressão de um mecanismo
10 de ativação do gene, uma deleção de toda ou parte da região promotora necessária para a expressão do gene ou uma deleção na região de codificação do gene. De preferência, a atenuação de um gene é essencialmente a deleção completa desse gene, gene o qual pode ser substituído por um gene
15 marcador de seleção que facilita a identificação, isolamento e purificação das cepas de acordo com a invenção. Um gene é, de preferência, inativado através da técnica de recombinação homóloga, conforme descrito em Datsenko, K.A. & Wanner, B.L. (2000) "One-step inactivation
20 of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 6640-6645. Outros métodos são descritos abaixo.

O termo "expressão" se refere à transcrição e tradução de uma seqüência gênica, levando à geração da proteína

correspondente, produto do gene.

O termo "reconstrução de um gene *tpiA* funcional na cepa evoluída" significa que a cepa evoluída selecionada é modificada após o processo de evolução através de introdução de um gene *tpiA* funcional; isso pode ser realizado através de substituição, via recombinação homóloga, da cópia atenuada do gene por uma cópia do tipo silvestre, assim, restaurando uma atividade de isomerase de fosfato de triose similar à atividade medida na cepa inicial ou através da introdução de um gene *tpiA* funcional sobre um *locus* cromossômico diferente ou através de introdução de um gene *tpiA* funcional sobre um plasmídeo. Essa restauração pode permitir um rendimento de produção de 1,2-propanodiol a partir de glicose de mais de 1 mol/mol por meio de reciclagem parcial de GA3P em DHAP para a produção de 1,2-propanodiol através da ação da isomerase de fosfato de triose.

A finalidade da atenuação da expressão de pelo menos um gene envolvido na conversão de metilglioxal (2-oxo propanal) em lactato é inibir a conversão de metilglioxal em lactato, de modo que o metilglioxal presente seja usado pela maquinaria celular essencialmente para a síntese de 1,2-propanodiol.

Os genes envolvidos na conversão de metilglioxal em

lactato são, em particular:

- um gene que codifica uma glioxalase, por exemplo, o gene *gloA* que codifica glioxalase I, que catalisa a síntese de lactoil glutationa a partir de metilglioxal;

5 - os genes *aldA* e *aldB* que codificam uma dehidrogenase de lactaldeído (que catalisa a síntese de (S) lactato a partir de (S) lactaldeído).

A expressão de um ou mais desses genes é, vantajosamente, atenuada (ou o gene é completamente
10 deletado) na cepa inicial. De preferência, o gene *gloA* é deletado.

Uma modificação adicional é, vantajosamente, feita na cepa inicial consistindo em supressão das vias naturais de fermentação de glicose, as quais consomem equivalentes de
15 redução como NADH e, portanto, competem com a via biossintética de 1,2-propanodiol.

Em particular, é vantajoso atenuar a expressão do gene *ldhA* que codifica dehidrogenase de lactato que catalisa a síntese de lactato a partir de piruvato e a expressão do
20 gene *adhE* que codifica dehidrogenase de álcool-aldeído que catalisa a síntese de etanol a partir de acetil-CoA.

Similarmente, é possível forçar o microorganismo a usar o complexo de dehidrogenase de piruvato para produzir acetil-CoA e NADH a partir de piruvato. Isso pode ser

obtido através de atenuação da expressão dos genes *pflA* e *pflB* que codificam liase de formato de piruvato.

Atenuação de pelo menos um dos genes *edd* e *eda* que codificam as enzimas envolvidas na via de Entner-Doudoroff
5 é também útil para impedir o metabolismo direto de glicose em gliceraldeído-3-fosfato e piruvato que pode superar a via da síntese de 1,2-propanodiol.

Sob condições anaeróbicas ou microaeróbicas, a disponibilidade de NADH para a redução dos precursores em
10 1,2-propanodiol é, vantajosamente, aumentada. Isso é obtido aliviando a repressão sobre o ciclo de ácido tricarboxílico mediada pelo regulador global ArcA (codificado pelo gene *arcA*). A concentração de NADH na célula pode também ser aumentada através de inativação da dehidrogenase de NADH II
15 codificada pelo gene *ndh*. Portanto, de preferência, pelo menos um gene selecionado dentre *arcA* e *ndh* tem sua expressão atenuada.

De preferência, a cepa inicial é selecionada do grupo consistindo de bactérias, leveduras e fungos.

20 Mais preferivelmente, a cepa inicial é selecionada do grupo consistindo de Enterobacteriaceae, Bacillaceae, Clostridiaceae, Streptomycetaceae e Corynebacteriaceae.

Em uma modalidade preferida da invenção, a cepa inicial é *Escherichia coli* ou *Clostridium acetobutylicum*.

A cepa evoluída passível de ser obtida e a cepa evoluída tal como obtido através do processo previamente descrita são também um objetivo da invenção.

Essa cepa evoluída é vantajosa para modificar a expressão de genes específicos, isto é, aumentar ou atenuar a expressão do gene. Essas modificações permitem melhorar o desempenho de produção de 1,2-propanodiol.

Para obter uma superexpressão de um gene de interesse, aqueles habilitados na técnica conhecem diferentes métodos, por exemplo:

- Substituição do promotor endógeno por um promotor forte.
- Introdução, no microorganismo, de um vetor de expressão trazendo o referido gene de interesse.
- Introdução de cópias adicionais do gene de interesse no cromossoma.

Aqueles versados na técnica conhecerem várias técnicas para introdução de DNA em uma cepa bacteriana. Uma técnica preferida é eletroporação, a qual é bem conhecida por aqueles versados na técnica.

Para obter a atenuação da expressão de um gene, diferentes métodos são conhecidos por aqueles versados na técnica e são descritos abaixo.

Em uma modalidade específica da invenção, a cepa

evoluída é modificada através de uma atenuação da atividade de desidrogenase de gliceraldeído-3-fosfato (GAPDH) de forma a reduzir o fluxo na parte inferior de glicólise e redirecioná-lo à síntese de DHAP e, finalmente, 1,2-
 5 propanodiol (ver Figura 1). Essa atividade diminuída pode, em particular, ser obtida através de uma atenuação da expressão do gene *gapA*.

O termo "atenuação da atividade de uma enzima" se refere a uma diminuição de atividade da enzima de interesse comparada com a atividade observada em uma cepa evoluída antes de qualquer modificação. Aqueles versados na técnica conhecem numerosos meios para obter esse resultado, por exemplo:

- introdução de uma mutação no gene que diminui o
 15 nível de expressão desse gene ou o nível de atividade da proteína codificada

- substituição do promotor natural do gene por um promotor de baixa resistência, resultando em uma menor expressão

20 - uso de elementos que desestabilizam o RNA mensageiro correspondente ou a proteína

- deleção do gene se nenhuma expressão em geral é desejada.

Vantajosamente, na cepa evoluída, a eficiência de

importação de açúcar é aumentada. Uma atenuação forte da expressão do gene *gapA* que resulta em uma diminuição do fluxo de carbono na reação de GAPDH em maior de 50% resultará na síntese de menos de 1 mol de fosfoenol piruvato (PEP) por mol de glicose importada. O sistema de açúcar-fosfotransferase (PTS), que usualmente assegura a importação de açúcares simples para a célula, está associado a uma reação de fosforilação que proporciona glicose-6-fosfato. O fosfato necessário para essa reação é fornecido através da conversão de PEP em piruvato. Assim, diminuição da quantidade de PEP produzido, por meio de redução do fluxo através do gliceraldeído-3-fosfato, reduz a importação de açúcar.

Em uma modalidade específica da invenção, o açúcar poderia ser importado para o microorganismo através de um sistema de importação de açúcar independente da disponibilidade de fosfoenol piruvato. O simporter de galactose-prótons codificado pelo gene *galP*, que não envolve fosforilação, pode ser utilizado. Nesse caso, a glicose importada precisa ser fosforilada pela quinase de glicose codificada pelo gene *glk*. Para promover essa via, a expressão de pelo menos um gene selecionado dentre *galP* e *glk* é aumentada. Como um resultado, o PTS se torna dispensável e pode ser eliminado através de atenuação da

expressão de pelo menos um gene selecionado dentre *ptsH*, *ptsI* ou *err*.

Em outra modalidade específica da invenção, a eficiência do PTS é aumentada através de aumento da disponibilidade do metabólito PEP. Em virtude da atenuação da atividade de *gapA* e do menor fluxo de carbono ao piruvato, a quantidade de PEP na cepa modificada da invenção poderia ser limitada, levando a uma menor quantidade de glicose transportada para a célula.

Existem vários meios que podem ser usados para aumentar a disponibilidade de PEP em uma cepa de microorganismo. Em particular, uma forma é atenuar a reação $\text{PEP} \rightarrow \text{piruvato}$. De preferência, a expressão de pelo menos um gene selecionado dentre *pykA* e *pykE*, que codificam a enzima quinase de piruvato, é atenuada na referida cepa para obter esse resultado. Outra forma para aumentar a disponibilidade do PEP é favorecer a reação $\text{piruvato} \rightarrow \text{PEP}$, catalisada pela sintase de fosfoenol piruvato através de aumento da atividade da enzima. Essa enzima é codificada pelo gene *ppsA*. Portanto, de preferência, no microorganismo, a expressão do gene *ppsA* é aumentada. Ambas as modificações podem estar presentes no microorganismo simultaneamente.

Especialmente, sob condições anaeróbicas ou microaeróbicas, é vantajoso se o complexo de dehidrogenase de piruvato (PDC), que converte piruvato em acetil-CoA, tem baixa sensibilidade à inibição pelo NADH. O termo "baixa sensibilidade" é definido com referência à sensibilidade de uma enzima não modificada, conforme já demonstrado no WO 2005/073364. Em particular, tal característica pode ser obtida através de introdução de uma mutação específica no gene *lpd* (que codifica a subunidade dehidrogenase de lipoamida da PDC), resultando na substituição de alanina na seqüência da proteína da enzima por uma valina.

Em outra modalidade específica da invenção, a síntese do subproduto acetato é impedida. Sob condições totalmente aeróbicas, o co-fator reduzido NADH é, de preferência, oxidado em NAD⁺ via a cadeia respiratória, com oxigênio como um aceitador de elétrons terminal. Portanto, a síntese de um co-produto (por exemplo, acetato) não é obrigatória. É preferível evitar tal síntese de acetato para aperfeiçoar a produção de 1,2-propanodiol.

Para impedir a produção de acetato, vantajosamente, a atividade de pelo menos uma enzima envolvida na síntese de acetato é atenuada. De preferência, a expressão de pelo menos um gene selecionado dentre *ackA*, *pta* e *poxB* é atenuada, todos esses genes codificando as enzimas

envolvidas em diferentes vias biossintéticas de acetato (ver Figura 1).

Outro objetivo da invenção é um método para preparo de 1,2-propanodiol em que uma cepa evoluída, tal como descrito
5 previamente, é crescida em um meio de crescimento apropriado contendo uma fonte de carbono e, então, o 1,2-propanodiol produzido é recuperado. A produção de 1,2-propanodiol é realizada sob condições aeróbicas, microaeróbicas ou anaeróbicas.

10 As condições de cultura (fermentação) para os microorganismos de acordo com a invenção podem ser prontamente definidas por aqueles habilitados na técnica. Em particular, bactérias são fermentadas em temperaturas entre 20°C e 55°C, de preferência entre 25°C e 40°C e, de
15 preferência, em torno de 35°C para *C. acetobutylicum* e em torno de 37°C para *E. coli*.

Esse processo pode ser realizado em um processo em batelada, em um processador alimentado em batelada ou em um processo contínuo.

20 A cepa evoluída pode ser usada para produzir 1,2-propanodiol sob condições aeróbicas, microaeróbicas ou anaeróbicas.

"Sob condições aeróbicas" significa que oxigênio é fornecido à cultura através de dissolução do gás na fase

líquida. Isso poderia ser obtido (1) purgando gás contendo oxigênio (por exemplo, ar) na fase líquida ou (2) agitando o vaso contendo o meio de cultura de forma a transferir o oxigênio contido no espaço superior para a fase líquida.

5 Vantagens da fermentação sob condições aeróbicas ao invés de condições anaeróbicas é que a presença de oxigênio como um aceitador de elétrons melhora a capacidade da cepa de produzir mais energia na forma de ATP para processos celulares. Portanto, a cepa tem seu metabolismo geral
10 aprimorado.

Condições microaeróbicas são definidas como condições de cultura em que baixos percentuais de oxigênio (por exemplo, usando uma mistura de gás contendo entre 0,1 e 10% de oxigênio, completo até 100% com nitrogênio) são
15 dissolvidos na fase líquida.

Condições anaeróbicas são definidas como condições de cultura em que nenhum oxigênio é fornecido ao meio de cultura. Condições estritamente anaeróbicas são obtidas através de purgação de um gás inerte, tal como nitrogênio,
20 no meio de cultura para remover traços de outro gás. Nitrato pode ser usado como um aceitador de elétrons para melhorar a produção de ATP pela cepa e melhorar seu metabolismo.

A cultura de cepas, durante o processo de evolução e o

processo de fermentação para produção de 1,2-propanodiol, é conduzida em fermentadores com um meio de cultura de composição conhecida adaptada à bactéria usada, contendo pelo menos uma fonte de carbono. Em particular, um meio de

5 crescimento mineral para *E. coli* pode, assim, ser de composição idêntica ou similar ao meio M9 (Anderson, 1946, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 32: 120-128), meio M63 (Miller, 1992; *A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related*

10 *Bacteria*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York) ou um meio tal como aquele definido por Schaefer e colaboradores (1999, *Anal. Biochem.* **270**: 88-96) e, em particular, o meio de cultura mínimo denominado MPG descrito abaixo:

K ₂ HPO ₄	1,4 g/l
Ácido nitrilo	0,2 g/l
Solução de	10 ml/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	1 g/l
NaCl	0,2 g/l
NaHCO ₃	0,2 g/l
MgSO ₄	0,2 g/l
glicose	20 a 100
NaNO ₃	0,424 g/l
tiamina	10 mg/l
FeSO ₄ , 7H ₂ O	50 mg/l
Extrato de levedo	4 g/l

O pH do meio é ajustado para 7,4 com hidróxido de sódio.

*Solução de elementos vestigiais: 4,37 g/L de ácido cítrico, 3 g/L de MnSO_4 , 1 g/L de CaCl_2 , 0,1 g/L de
5 $\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,10 g/L de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 mg/L de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 10 mg/L de H_3BO_3 , 8,31 mg/L de Na_2MoO_4 .

Em uma modalidade específica da invenção, o método é realizado com uma cepa evoluída de *E. coli* em um meio de crescimento contendo uma fonte de carbono simples que pode
10 ser: arabinose, frutose, galactose, glicose, lactose, maltose, sacarose ou xilose. Uma fonte de carbono simples especialmente preferida é glicose.

Em outra modalidade específica da invenção, o método é realizado com uma cepa evoluída de *Clostridium*
15 *acetobutylicum* em um meio de crescimento contendo uma fonte de carbono simples ou complexa.

O meio para *C. acetobutylicum* pode, assim, ser de composição idêntica ou similar ao meio de Crescimento Clostridial (CGM, Wiesenborn e colaboradores, Appl.
20 Environm. Microbiol., 54: 2717-2722) ou um meio de crescimento mineral conforme fornecido por Monot e colaboradores (Appl. Environm. Microbiol., 44: 1318-1324) ou Vasconcelos e colaboradores (J. Bacteriol., 176: 1443-1450).

A fonte de carbono usada para a cultura de *C. acetobutylicum* é um carbono simples ou complexo. A fonte de carbono simples pode ser arabinose, frutose, galactose, glicose, lactose, maltose, sacarose ou xilose. Uma fonte de
5 carbono complexa pode ser amido ou hemicelulose. Uma fonte de carbono complexa especialmente preferida é amido.

De preferência, o 1,2-propanodiol recuperado é, além disso, purificado. Aqueles versados na técnica conhecem métodos para recuperação e purificação do 1,2-propanodiol
10 produzido. Esses métodos são processos usuais.

A invenção é descrita acima, abaixo e nos Exemplos com relação a *E. coli*. Assim, os genes que podem ser atenuados, deletados ou superexpressos para as cepas inicial e evoluída de acordo com a invenção são definidos
15 principalmente usando a denominação dos genes a partir de *E. coli*. Contudo, essa designação tem um significado mais geral de acordo com a invenção e abrange os genes correspondentes em outros microorganismos usando as referências no GenBank dos genes de *E. coli*, aqueles
20 habilitados na técnica podem determinar genes equivalentes em outros organismos que não *E. coli*. Os meios de identificação de seqüências homólogas e suas homologias percentuais são bem conhecidos por aqueles habilitados na técnica e incluem, em particular, os programas BLAST que

podem ser usados no website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> com os parâmetros de default indicados nesse website. As seqüências obtidas podem ser exploradas (alinhas) usando, por exemplo, os programas CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) com os parâmetros de default indicados nesse website.

O banco de dados PFAM (banco de dados de famílias de proteína de alinhamentos e modelos ocultos de Markov <http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>) é uma grande coleção de alinhamentos de seqüências de proteína. Cada PFAM torna possível visualizar múltiplos alinhamentos, ver domínios de proteína, avaliar distribuições entre organismos, obter acesso a outros bancos de dados e visualizar estruturas de proteínas conhecidas.

COGs (agrupamentos de grupos ortólogos de proteínas <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>) são obtidos comparando seqüências de proteína derivadas de 66 genomas totalmente seqüenciados representando 44 linhagens filogenéticas principais. Cada COG é definido a partir de pelo menos três linhagens, tornando possível identificar domínios conservados ancestrais.

REFERÊNCIAS *na ordem de citação no texto*

1. Badia J, Ros J, Aguilar J (1985), *J. Bacteriol.* **161**: 435-437

2. Tran Din K e Gottschalk G (1985), *Arch. Microbiol.*
142: 87-92
3. Cameron DC e Cooney CL (1986), *Bio/Technology*, **4**:
651-654
- 5 4. Sanchez-Rivera F, Cameron DC, Cooney CL (1987),
Biotechnol. Lett. **9**: 449-454
5. Altaras NE e Cameron DC (1999), *Appl. Environ.*
Microbiol. **65**: 1180-1185
6. Cameron DC, Altaras NE, Hoffman ML, Shaw AJ (1998),
10 *Biotechnol. Prog.* **14**: 116-125
7. Altaras NE e Cameron DC (2000), *Biotechnol. Prog.*
16: 940-946
8. Huang K, Rudolph FB, Bennett GN (1999), *Appl.*
Environ. Microbiol. **65**: 3244-3247
- 15 9. Berrios-Rivera SJ, San KY, Bennett GN (2003), *J.*
Ind. Microbiol. Biotechnol. **30**: 34-40
10. Datsenko KA e Wanner BL (2000), *Proc. Natl. Acad.*
Sci. USA **97**: 6640-6645
11. Anderson EH (1946), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **32**:
20 120-128
12. Miller (1992), A Short Course in Bacterial
Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia*
coli and Related Bacteria, Cold Spring Harbor Laboratory
Press, Cold Spring Harbor, New York

13. Schaefer U, Boos W, Takors R, Weuster-Botz D (1999), *Anal. Biochem.* **270**: 88-96

14. Wiesenborn DP, Rudolph RB, Papoutsakis ET (1987), *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2717-2722

5 15. Monot F, Martin JR, Petitdemange H, Gay R (1982), *Appl. Environ. Microbiol.* **44**: 1318-1324

16. Vasconcelos I, Girbal L, Soucaille P (1994), *J. Bacteriol.* **176**: 1443-1450

EXEMPLOS

10 Os exemplos a seguir mostram:

1. A construção de uma cepa modificada de *E. coli* MG1655 *Ipd**, $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $\Delta ldhA$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$, Δedd , $\Delta arcA$, Δndh .

2. A evolução da referida cepa inicial.

15 3. A reconstrução do gene *tpiA* na cepa evoluída selecionada.

4. Atenuação do gene *gapA*; deleção dos genes *pykA* e *pykF*; superexpressão do gene *ppsA*.

5. A deleção dos genes *ackA*, *pta*, *poxB*.

20 6. Comparação de várias cepas obtidas com relação à produção de 1,2-propanodiol sob condições aeróbicas.

7. Produção de 1,2-propanodiol em cultura alimentada em batelada com a melhor cepa.

Exemplo 1: Construção de uma cepa modificada de *E. coli* MG1655 *Ipd**, $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $\Delta ldhA$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$, Δedd , $\Delta arcA$, Δndh capaz de evoluir à produção aprimorada de 1,2-propanodiol

5 a) Construção de uma cepa modificada de *E. coli* MG1655 *Ipd**, $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, *ldhA::Km*, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$, Δedd

O cassete de resistência ao clorafenicol foi eliminado na cepa de *E. coli* MG1655 *Ipd**, $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$,
10 *IdhA::km*, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$, $\Delta edd::cm$ (ver WO2005073364) de acordo com o Protocolo 1.

Protocolo 1: Eliminação de cassetes de resistência

Os cassetes de resistência ao clorafenicol e/ou canamicina foram eliminados de acordo com a seguinte
15 técnica. O plasmídeo pCP20 trazendo a recombinase FLP que atua nos sítios FRT dos cassetes de resistência ao clorafenicol e/ou canamicina foi introduzido na cepa através de eletroporação. Após cultura serial a 42°C, a perda dos cassetes de resistência a antibiótico foi
20 verificada através de análise por PCR com os oligonucleotídeos fornecidos na Tabela 1.

A presença das modificações feitas previamente na cepa foi verificada usando os oligonucleotídeos fornecidos na

Tabela 1.

A cepa obtida foi denominada *E. coli* MG1655 *Ipd**, $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $IdhA::km$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$, Δedd .

Tabela 1: Oligonucleotídeos usados para verificar a
5 inserção de um cassete de resistência ou a perda de um
cassete de resistência

Nome da região	Nomes dos	SEQ ID	Homologia com região
	<u>oligos</u>		<u>cromossômica</u>
Gene <i>tpiA</i> (deleção)	cdh YIIQ	N° 1 N° 2	Ver WO2005073364
Gene <i>pflAB</i>	pflABF pflABR	N° 3 N° 4	Ver WO2005073364
Gene <i>adhE</i>	ychGf adhECr	N° 5 N° 6	Ver WO2005073364
Gene <i>IdhA</i> (inserção de cassete)	hsIJC ldhAC2	N° 7 N° 8	Ver WO2005073364
Gene <i>gloA</i>	NemACd RntCr	N° 9 N° 10	Ver WO2005073364
Gene <i>aldA</i>	Ydc F C f gapCCr	N° 11 N° 12	Ver WO2005073364
Gene <i>aldB</i>	aldB C f YiaYCr	N° 13 N° 14	Ver WO2005073364

Gene <i>edd</i>	Edad	N° 15	Ver WO2005073364
	Zwf r	N° 16	
Gene <i>IdhA</i> (deleção)	ldhAF	N° 17	1439724 a 1439743
	ldhAR	N° 18	1441029 a 1441007
Gene <i>arcA</i>	arcAF	N° 19	4638292 a 4638273
	arcAR	N° 20	4636854 a 4636874
Gene <i>ndh</i>	ndhF	N° 21	1164722 a 1164742
	ndhR	N° 22	1167197 a 1167177
Gene <i>tpiA</i> (reconstrução)	YIIQ	N° 2	4109599 a 4109580
	tpiAR	N° 23	4108953 a 4108973
Promotor de <i>gapA</i> (Ptrcl6- <i>gapA</i>)	yeaAF	N° 24	1860259-1860287
	gapAR	N° 25	1861068-1861040
Gene <i>pykA</i>	pykAF	N° 26	1935338 a 1935360
	pykAR	N° 27	1937425 a 1937401
Gene <i>pykF</i>	pykFF	N° 28	1753371 a 1753392
	pykFR	N° 29	1755518 a 1755495
Genes <i>ackA-pta</i>	B2295	N° 30	2410900 a 2410919
	YfcCR	N° 31	2415164 a 2415145
Gene <i>poxB</i>	poxBF	N° 32	908475 a 908495
	poxBR	N° 33	910375 a 910352

b) Construção de uma cepa modificada de *E. coli* MG1655

*Ipd**, *ΔtpiA*, *ΔpflAB*, *ΔadhE*, *ΔldhA::cm*, *ΔgloA*, *ΔaldA*,
ΔaldB, *Δedd*

De forma a eliminar o cassete de resistência à
 canamicina e inativar o gene *IdhA*, o cassete de resistência
 5 ao clorafenicol foi inserido no gene *IdhA* deletando o gene
 em questão de acordo com o Protocolo 2.

Protocolo 2: Introdução de um produto de PCR para
 recombinação e seleção dos recombinantes

Os oligonucleotídeos escolhidos e fornecidos na Tabela
 10 2 para substituição de um gene ou uma região intergênica
 foram usados para amplificar o cassete de resistência ao
 clorafenicol a partir do pKD3 ou o cassete de resistência à
 canamicina do plasmídeo pKD4 (Datsenko, K.A. & Wanner, B.L.
 (2000)). O produto de PCR obtido foi, então, introduzido
 15 através de eletroporação na cepa recipiente trazendo o
 plasmídeo pKD46 no qual o sistema λ Red (γ , β , exo)
 expresso favorece grandemente a recombinação homóloga. Os
 transformantes resistentes a antibiótico foram, então,
 selecionados e a inserção do cassete de resistência foi
 20 verificada através de análise por PCR com os
 oligonucleotídeos apropriados fornecidos na Tabela 1.

As outras modificações da cepa foram verificadas com
 os oligonucleotídeos fornecidos na Tabela 1.

A cepa resultante foi denominada *E. coli* MG1655 *Ipd**, *Δldh::cm*, *ΔtpiA*, *ΔpflAB*, *ΔadhE*, *ΔgloA*, *ΔaldA*, *ΔaldB*, *Δedd*.

Tabela 2: Oligonucleotídeos usados para substituição de uma região cromossômica através de recombinação com um produto

5 de PCR na cepa de *E. coli* MG1655

Nome da região	Nomes dos oligos	SEQ ID	Homologia com região cromossômica
Gene <i>ldhA</i>	DldhAF	N° 34	1440865-1440786
	DldhAR	N° 35	1439878-1439958
Gene <i>arch</i>	DarcAF	N° 36	4637868-4637791
	DarcAR	N° 37	4637167-4637245
Gene <i>ndh</i>	DndhF	N° 38	1165071-1165149
	DndhR	N° 39	1166607-1166528
Gene <i>tpiA</i> (reconstrução)	tpiA::kmF	N° 40	4109264-4109195
	tpiA::kmR	N° 41	4109109-4109193
Promotor <i>gapA</i> (Ptrc16-gapA)	Ptrc-gapAF	N° 42	1860478-1860536
	Ptrc-gapAR	N° 43	1860762-1860800
Gene <i>pykA</i>	DpykAF	N° 44	1935756-1935836
	DpykAR	N° 45	1937055-1937135
Gene <i>pykF</i>	DpykFF	N° 46	1753689-1753766
	DpykFR	N° 47	1755129-1755051
Gene <i>ackA-pta</i>	DackAF	N° 48	2411494-2411573

	DptaR	N° 49	2414906-2414830
Gene <i>poxB</i>	DpoxBF	N° 50	908557-908635
	DpoxBR	N° 51	910262-910180

c) Construção de uma cepa modificada de *E. coli* MG1655 $\Delta arcA::km$

O gene *arcA* foi inativado na cepa de *E. coli* MG1655 através de inserção de um cassete de resistência ao antibiótico canamicina e deleção da maioria do gene em questão usando a técnica descrita no Protocolo 2 com os oligonucleotídeos fornecidos na Tabela 2. A cepa resultante foi denominada *E. coli* MG1655 $\Delta arcA::km$.

10 d) Construção de uma cepa modificada de *E. coli* MG1655 *Ipd**, $\Delta tpiA$, $\Delta plfAB$, $\Delta adhE$, $\Delta ldhA$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$, Δedd , $\Delta arcA$

A deleção do gene *arcA* através de substituição do gene por um cassete de resistência à canamicina na cepa *E. coli* MG1655 *Ipd**, $\Delta tpiA$, $\Delta flAB$, $\Delta adhE$, $\Delta ldhA::cm$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$, Δedd foi realizada através da técnica de transdução com fago PI.

Protocolo 3: Transdução com fago PI para deleção de um gene

20 A deleção do gene escolhido através de substituição do gene por um cassete de resistência (clorafenicol ou

canamicina) na cepa de *E. coli* recipiente foi realizada através da técnica de transdução com fago P1. O protocolo foi em duas etapas, (i) o preparo do lisato de fago sobre a cepa MG1655 com um único gene deletado e (ii) a transdução da cepa recipiente através desse lisato de fago.

Preparo do lisato de fago

- Cultura com 100 µl de uma cultura noturna da cepa MG1655 com um único gene deletado de 10 ml de LB + 30 µg/ml de Cm + glicose a 0,2% + CaCl₂ a 5 mM.
- 10 - Incubação durante 30 min a 37°C com agitação.
- Adição de 100 µl de lisato de fago P1 preparado sobre a cepa MG1655 do tipo silvestre (aprox. 1×10^9 fagos/ml).
- Agitação a 37°C durante 3 horas até que todas as
15 células tenham sido submetidas à lise.
- Adição de 200 µl de clorofórmio e turbilhonamento.
- Centrifugação durante 10 min a 4500 g para eliminar os resíduos celulares.
- Transferência do sobrenadante para um tubo estéril e
20 adição de 200 µl de clorofórmio.
- Armazenamento do lisato a 4°C.

Transdução

- Centrifugação durante 10 min a 1500 g de 5 ml de uma

cultura noturna da cepa recipiente de *E. coli* em meio LB.

- Suspensão da pelota de células em 2,5 ml de MgSO_4 a 10 mM, CaCl_2 a 5 mM.

- Tubos de Controle: 100 μl de células

5 100 μl de fagos P1 da cepa MG1655 com um único gene deletado

- Tubo de ensaio: 100 μl de células + 100 μl de fagos P1 da cepa MG1655 com um único gene deletado.

- Incubação durante 30 min a 30°C sem agitação.

10 - Adição de 100 μl de citrato de sódio a 1M em cada tubo e turbilhonamento.

- Adição de 1 ml de LB.

- Incubação durante 1 hora a 37°C com agitação.

- Colocação de 30 $\mu\text{g/ml}$ sobre discos LB + CM após
15 centrifugação dos tubos durante 3 min a 7000 rpm.

- Incubação a 37°C durante a noite.

Os transformantes resistentes a antibiótico foram, então, selecionados e a inserção da deleção foi verificada através de uma análise por PCR com os oligonucleotídeos
20 apropriados fornecidos na Tabela 1.

A cepa resultante foi denominada *E. coli* MG1655 *Ipd**, ΔtpiA , ΔpflAB , ΔadhE , $\Delta\text{ldhA}::\text{cm}$, ΔgloA , ΔaldA , ΔaldB , Δedd , $\Delta\text{arcA}::\text{km}$.

Os cassetes de resistência ao clorafenicol e canamicina foram, então, eliminados de acordo com o Protocolo 1. A cepa obtida foi denominada *E. coli* MG1655 *Ipd**, $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $\Delta ldhA$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$,
 5 Δedd , $\Delta arcA$.

e) Construção de uma cepa modificada de *E. coli* MG1655 $\Delta ndh::km$

O gene *ndh* foi inativado através de inserção de um cassete de resistência ao antibiótico canamicina e deleção
 10 da maioria do gene em questão usando a técnica descrita no Protocolo 2 com os oligonucleotídeos fornecidos na Tabela 2. A cepa resultante foi denominada *E. coli* MG1655 $\Delta ndh::km$.

f) Construção de uma cepa de *E. coli* MG1655 *Ipd**, $\Delta tpiA$,
 15 $\Delta plfAB$, $\Delta adhE$, $\Delta ldhA$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$, Δedd , $\Delta arcA$, Δndh

A deleção do gene *ndh* através de substituição do gene por um cassete de resistência à canamicina na cepa de *E. coli* MG1655 *Ipd**, $\Delta tpiA$, $\Delta plfAB$, $\Delta adhE$, $\Delta ldhA$, $\Delta gloA$,
 20 $\Delta aldA$, $\Delta aldB$, Δedd , $\Delta arcA$ foi realizada conforme previamente usando a técnica de transdução com o fago PI descrita no Protocolo 3.

A cepa resultante foi denominada *E. coli* MG1655 *Ipd**,

ΔtpiA, ΔpflAB, ΔadhE, ΔldhA, ΔgloA, ΔaldA, ΔaldB, Δedd, ΔarcA, Δndh::km.

O cassete de resistência à canamicina foi, então, eliminado de acordo com o Protocolo 1. A cepa obtida foi denominada *E. coli* MG1655 *Ipd**, *ΔtpiA, ΔpflAB, ΔadhE, ΔldhA, ΔgloA, ΔaldA, ΔaldB, Δedd, ΔarcA, Δndh.*

Em cada etapa, a presença das modificações feitas previamente na cepa foi verificada usando os oligonucleotídeos fornecidos na Tabela 1.

Exemplo 2: Evolução da cepa modificada *E. coli* MG1655 *Ipd** *ΔtpiA, ΔpflAB, ΔadhE, ΔldhA::cm, ΔgloA, ΔaldA, ΔaldB, Δedd* em cultura em Chemostat sob condições microaeróbicas e caracterização fisiológica de evolução

Para evoluir à produção aprimorada de 1,2-propanodiol, a cepa de *E. coli* MG1655 *Ipd** *ΔtpiA, ΔpflAB, ΔadhE, ΔldhA::cm, ΔgloA, ΔaldA, ΔaldB, Δedd* foi cultivada em cultura contínua sob condições anaeróbicas por um lado e sob condições microaeróbicas (1% de oxigênio) por outro lado no meio de cultura MPG, tal como descrito anteriormente, com glicose em excesso (de 20 g/l inicialmente com adição se a glicose se torna esgotada). A temperatura foi ajustada a 37°C e o pH foi regulado a 6,5 através da adição de uma base. A evolução da cepa nos

Chemostats foi acompanhada através do aumento da concentração de biomassa associada ao aumento das concentrações do produto, 1,2-propanodiol, e do co-produto acetato, durante várias semanas (de 4 semanas até 6 meses).

5 Isso denotou o aprimoramento dos desempenhos das cepas. Quando as culturas atingiram um estado uniforme sem mais nenhum aumento das concentrações sob essas condições, a evolução foi feita.

As características das cepas antes e após evolução
10 foram avaliadas. Colônias únicas representando clones individuais foram isoladas sobre discos de Petri. Esses clones foram avaliados usando a cepa inicial como controle em um ensaio em frasco de Erlenmeyer usando o mesmo meio MPG usado na cultura em Chemostat. Dentre esses clones,
15 vários apresentaram melhores taxas específicas de produção de 1,2-propanodiol quando comparado com o controle. Esses clones foram selecionados para as etapas seguintes. Os resultados obtidos com o melhor clone para cada condição de evolução são reportados nas Tabelas 4 e 5 abaixo.

20 Tabela 4: Comparação do clone melhor evoluído após evolução sob condições anaeróbicas com a cepa inicial

Cepa <i>E. coli</i> MG1655 lpd* $\Delta tpiA$ $\Delta pflAB$ $\Delta adhE$	Cepa inicial antes de	Clones melhor evoluídos
---	--------------------------	----------------------------

<i>ΔldhA::cm ΔgloA Δald,</i> <i>ΔaldB Δedd</i>	evolução (desempenhos medidos após 2 dias de cultura)	(desempenhos medidos após 2 dias de cultura)
Taxa específica de consumo de glicose (g de glicose /g de biomassa /h)	0,12	0,21 (+ 75%)
Taxa específica de produção de 1,2- propanodiol (g de 1,2- propanodiol /g de biomassa /h)	0,02	0,07 (+250%)
Taxa específica de produção de 1,2- propanodiol + hidróxiacetona (g de 1,2-propanodiol + hidróxiacetona /g de biomassa /h)	0,04	0,08 (+ 100%)

Tabela 5: Comparação do clone melhor evoluído após evolução sob condições microaeróbicas com a cepa inicial

Cepa <i>E. coli</i> MG1655 <i>lpd* ΔtpiA ΔpflAB ΔadhE</i> <i>ΔldhA::cm ΔgloA Δald,</i> <i>ΔaldB Δedd</i>	Cepa inicial antes de evolução (desempenhos medidos após 2 dias de cultura)	Clones melhor evoluídos (desempenhos medidos após 2 dias de cultura)
Taxa específica de consumo de glicose (g de glicose /g de biomassa /h)	0,10	0,22 (+ 120%)
Taxa específica de produção de 1,2- propanodiol (g de 1,2- propanodiol /g de biomassa /h)	0,01	0,08 (+700%)
Taxa específica de produção de 1,2- propanodiol + hidróxiacetona (g de 1,2-propanodiol + hidróxiacetona /g de biomassa /h)	0,04	0,08 (+ 100%)

Uma vez que esses clones foram cultivados durante um

período de tempo prolongado sobre meio de cultura com extrato de levedo, eles precisaram ser adaptados para crescimento em meio mínimo. Os dois melhores clones cujos desempenhos são fornecidos nas Tabelas 4 e 5 foram adaptados através de cultura serial sobre meio mínimo de forma a aumentar suas taxas de crescimento sob tais condições e a adaptação foi cessada quando suas taxas de crescimento estavam estáveis. Os clones da cultura final foram isolados e verificados como sendo representativos da população adaptada.

Exemplo 3: Reconstrução do gene *tpiA* na cepa evoluída selecionada de *E. coli* MG1655 *Ipd**, $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $\Delta ldhA::cm$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$, Δedd :

a) Construção de uma cepa modificada de *E. coli* MG1655 *tpiA::km*

Um cassete de resistência ao antibiótico canamicina foi inserido a montante do gene *tpiA* de acordo com a técnica descrita no Protocolo 2 com os oligonucleotídeos fornecidos na Tabela 2. A cepa resultante é denominada *E. coli* MG1655 *tpiA::km*.

Então, a reconstrução do gene *tpiA* na cepa evoluída de *E. coli* MG1655 *Ipd**, $\Delta tpiA$, $\Delta pflAB$, $\Delta adhE$, $\Delta ldhA::cm$, $\Delta gloA$, $\Delta aldA$, $\Delta aldB$, Δedd , $\Delta arcA$, Δndh foi realizada

usando a técnica de transdução com o fago PI descrito no Protocolo 3.

A cepa resultante foi denominada *E. coli* evoluída MG1655 *Ipd**, *tpiArc::km* Δ *plfAB*, Δ *adhE*, Δ *ldhA::cm*, Δ *gloA*,
5 Δ *aldA*, Δ *aldB*, Δ *edd*, Δ *arcA*, Δ *ndh*.

Os cassetes de resistência à canamicina e clorafenicol foram, então, eliminados de acordo com o Protocolo 2. A cepa obtida foi denominada '*E. coli* evoluída *tpiArc*'.

A presença das modificações feitas previamente na cepa foi
10 verificada usando os oligonucleotídeos fornecidos na Tabela 1.

Exemplo 4: Modificações da '*E. coli* evoluída *tpiArc*' :
atenuação do gene *gapA*; deleção dos genes *pykA* e *pykF*;
superexpressão do gene *ppsA* com um vetor *pJB137-PgapA-ppsA*

15 a) Substituição do promotor de *gapA* natural pelo promotor curto sintético *Ftrc16*:

A substituição do promotor de *gapA* natural pelo promotor curto sintético *Ptrc16* (SEQ ID NO 52: gagctggttgacgattaatcatccggctcgaataatgtgtggaa) na cepa "*E.*
20 *coli* evoluída *tpiArc*' foi feita através de substituição de 225 pb da sequência do *gapA* a montante por FRT-CmR-FRT e um promotor manipulado.

A técnica usada é descrita no Protocolo 2 com os

oligonucleotídeos fornecidos na Tabela 2. A cepa resultante é denominada '*E. coli* evoluída *tpiArc*' *Pttrc16-gapA::cm*.

O cassete de resistência ao clorafenicol foi, então, eliminado de acordo com o Protocolo 1. A cepa obtida foi denominada '*E. coli* evoluída *tpiArc*' *Pttrc16-gapA*.

b) Deleção do gene *pykA*

O gene *pykA* é inativado através de inserção de um cassete de resistência ao antibiótico canamicina e deleção da maioria do gene em questão usando a técnica descrita no Protocolo 2 com os oligonucleotídeos fornecidos na Tabela 2. A cepa resultante é denominada '*E. coli* evoluída *tpiArc*' *Pttrc16-gapA ΔpykA::km*.

O cassete de resistência à canamicina é, então, eliminado de acordo com o Protocolo 1. A cepa obtida é denominada *E. coli* evoluída *tpiArc*' *Pttrc16-gapA ΔpykA*.

c) Deleção do gene *pykF*

O gene *pykF* é inativado através de inserção de um cassete de resistência ao antibiótico canamicina e deleção da maioria do gene em questão usando a técnica descrita no Protocolo 2 com os oligonucleotídeos fornecidos na Tabela 2. A cepa resultante é denominada *E. coli* evoluída *tpiArc*' *Pttrc16-gapA, ΔpykA ΔpykF::km*.

Conforme previamente, o cassete de resistência à

canamicina é, então, eliminado de acordo com o Protocolo 1. A cepa obtida é denominada *E. coli* evoluída *tpiArc'Ptrc16-gapA, ΔpykA, ΔpykF*.

d) Introdução de um vetor de expressão *pJB137-PgapA-ppsA* na
5 cepa

Para aumentar a produção de fosfoenol piruvato, o gene *ppsA* foi expresso a partir do plasmídeo *pJB137* usando o promotor de *gapA*. Para a construção do plasmídeo *pJB137-PgapA-ppsA*, o gene *ppsA* foi amplificado por PCR a partir do
10 DNA genômico de *E. coli* MG1655 usando os seguintes oligonucleotídeos:

1. *gapA-ppsAF*, consistindo de 65 bases (SEQ ID NO 53)

ccttttattcactaacaataagctggtggaatatATGTCCAACAATGGCTCGTC
ACCGCTGGTGC

15 com:

- uma região (letras maiúsculas) homóloga à sequência (1785106-1785136) do gene *ppsA* (1785136 a 1782758), uma sequência de referência no website <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>) e

20 - uma região (letras minúsculas) homóloga ao promotor de *gapA* (1860794 - 1860761).

2. *ppsAR*, consistindo de 43 bases (SEQ ID NO 54)

aatcgcaagcttGAATCCGGTTATTTCTTCAGTTCAGCCAGGC

com:

- uma região (letras maiúsculas) homóloga à sequência (1782758 - 1782780)

- a região do gene *ppsA* (1785136 a 1782758)

- um sítio de restrição *HindIII* (letras sublinhadas)

5 Ao mesmo tempo, a região promotora de *gapA* do gene *gapA* de *E. coli* foi amplificada usando os seguintes oligonucleotídeos:

1. *gapA-ppsAR*, consistindo de 65 bases (SEQ ID NO 55)

GCACCAGCGGTGACGAGCCATTGTTGGACATatattccaccagctatttgtag

10 tgaataaaaagg

com:

- uma região (letras maiúsculas) homóloga à sequência (1785106 -1785136) do gene *ppsA* (1785136 a 1782758) e

15 de *gapA* (1860794 - 1860761).

- uma região (letras minúsculas) homóloga ao promotor

2. *gapAF*, consistindo de 33 bases (SEQ ID NO 56)

ACGTCCCGGGcaagcccaaaggaagagtgaggc

com:

20 de *gapA* (1860639 - 1860661).

- uma região (letras minúsculas) homóloga ao promotor

- um sítio de restrição *SmaI* (letras sublinhadas)

Ambos os fragmentos foram subsequenteemente fundidos usando os oligonucleotídeos *ppsAR* e *gapAF* (Horton e colaboradores, 1989 Gene 77: 61-68). O fragmento

amplificado por PCR foi cortado com as enzimas de restrição *HindIII* e *SmaI* e clonado nos sítios *HindIII*/*SmaI* do vetor pJB137 (Número de Acesso ao EMBL: U75326), proporcionando o vetor pJB137-PgapA-ppsA. Plasmídeos recombinantes foram
 5 verificados através de seqüenciamento de DNA.

O plasmídeo pB137-PgapA-ppsA é introduzido na cepa evoluída de *E. coli tpiArc Ptrc16-gapA, ΔpykA, ΔpykF*.

A cepa obtida é denominada *E. coli* evoluída *tpiArc Ptrc16-gapA, ΔpykA, ΔpykF, (pJB13 7-PgapA-ppsA)*.

10 Em cada etapa, a presença das modificações previamente feitas na cepa foi verificada usando os oligonucleotídeos fornecidos na Tabela 1.

Exemplo 5: Construção de uma cepa de *E. coli* evoluída *tpiArc Ptrc16-gapA, ΔpykA, ΔpykF, ΔackA-pta, ΔpoxB*
 15 *(pJB137-PgapA-ppsA)* capaz de produzir 1,2-propanodiol sem acetato como subproduto

a) Construção de uma cepa de *E. coli* modificada M1655 *ΔackA-pta::cm*

Os genes *ackA* e *pta* são inativados através de inserção
 20 de um cassete de resistência ao antibiótico clorafenicol e deleção da maioria do gene em questão usando a técnica descrita no Protocolo 2 com os oligonucleotídeos fornecidos na Tabela 2. A cepa resultante é denominada *E. coli* M1655

ΔackA-pta::cm.

b) Construção de uma cepa de *E. coli* evoluída *tpiArc*
Pttrcl6-gapA, ΔpykA, ΔpykF, ΔackA-pta

A deleção dos genes *ackA* e *pta* na cepa de *E. coli*
5 evoluída *tpiArc Pttrcl-gapA, ΔpykA, ΔpykF* é realizada
conforme previamente usando a técnica de transdução com
fago PI conforme descrito no Protocolo 3.

A cepa resultante é denominada *E. coli* evoluída *tpiArc*
Pttrcl6-gapA, ΔpykA, ΔpykF, ΔackA-pta::cm.

10 Conforme previamente, o cassete de resistência ao
clorafenicol é, então, eliminado de acordo com o Protocolo
1. A cepa obtida é denominada *E. coli* evoluída *tpiArc*
Pttrcl6-gapA, ΔpykA, ΔpykF, ΔackA-pta.

c) Construção de uma cepa modificada evoluída de *E. coli*
15 *tpiArc Pttrcl-gapA, ΔpykA, ΔpykF, ΔackA-pta, ΔpoxB (pJB137-*
PgapA-ppsA)

O gene *poxB* é inativado através de inserção de um
cassete de resistência ao antibiótico clorafenicol e
deleção da maioria dos genes em questão usando a técnica
20 descrita no Protocolo 2 com os oligonucleotídeos fornecidos
na Tabela 2.

A cepa resultante é denominada *E. coli* evoluída *tpiArc*
Pttrcl6-gapA, ΔpykA, ΔpykF, ΔackA-pta, ΔpoxB::cm.

Conforme previamente, o cassete de resistência ao clorafenicol é, então, eliminado de acordo com o Protocolo 1. A cepa obtida é denominada *E. coli* evoluída *tpiArc Ptrc16-gapA, ΔpykA, ΔpykF, ΔackA-pta, ΔpoxB*.

5 O plasmídeo pB137-PgapA-ppsA é introduzido na cepa de *E. coli* evoluída *tpiArc Ptrc1-gapA, ΔpykA, ΔpykF, ΔackA-pta, ΔpoxB*. A cepa obtida é denominada *E. coli* evoluída *tpiArc Ptrc16-gapA, ΔpykA, ΔpykF, ΔackA-pta, ΔpoxB (pJB137-PgapA-ppsA)*.

10 Em cada etapa, a presença das modificações previamente feitas na cepa é verificada usando os oligonucleotídeos fornecidos na Tabela 1.

Exemplo 6: Comparação das diferentes cepas evoluídas com relação à produção de 1,2-propanodiol sob condições
15 aeróbicas

As cepas obtidas conforme descrito no Exemplo 4 e as cepas de controle (controle 1: MG1655 *lpd* ΔtpiA ΔpflAB ΔadhE ΔldhA::Cm ΔgloA Δald, ΔaldB Δedd* evoluída sob condições anaeróbicas e controle 2: MG1655 *lpd* ΔtpiA
20 ΔpflAB ΔadhE ΔldhA::Cm ΔgloA Δald, ΔaldB Δedd* evoluída sob condições microaeróbicas) foram cultivadas em um ensaio em frasco de Erlenmeyer sob condições aeróbicas em meio mínimo suplementado com extrato de levedo e com glicose como fonte

de carbono. A cultura foi realizada a 34°C e o pH foi mantido através de tamponamento do meio de cultura com MOPS. Ao final da cultura, 1,2-propanodiol, acetol e glicose residual no caldo de fermentação foram analisados através de HPLC e os rendimentos de 1,2-propanodiol com relação à glicose e 1,2-propanodiol + acetol com relação à glicose foram calculadas. A melhor cepa é, então, selecionada para uma cultura de alimentação em batelada em um fermentador.

Cepa	Titulação de 1,2- propanodiol (g/l)	Titulação de acetol (g/l)	Rendimento de 1,2- propanodiol (g/g de glicose)	Rendimento de 1,2- propanodiol + acetol (g/g de glicose)
Controle 1	1,88	2,1	0,16	0,34
Controle 2	0,7	3,56	0,06	0,37
' <i>E. coli</i> evoluída <i>tpiArc'</i> , <i>P<trc16-gapa< i="">, (<i>pJB137-</i> <i>PgapA-ppsA</i>)</trc16-gapa<></i>	0,5	2,77	0,06	0,42

(construída a partir do controle 1)				
' <i>E. coli</i> evoluída <i>tpiArc</i> ', <i>Ptrc16-gapA</i> , (<i>pJB137-PgapA-ppsA</i>) (construída a partir do controle 2)	3,71	3,85	0,20	0,41

Exemplo 7: Produção de 1,2-propanodiol em cultura alimentada em batelada com a melhor cepa

A melhor cepa selecionada no experimento anterior foi
5 cultivada em um fermentador de 2 l usando um protocolo de alimentação em batelada.

A temperatura da cultura é mantida constante a 37°C e o pH é permanentemente ajustado para valores entre 6,5 e 8 usando uma solução de NH₄OH. A agitação é mantida entre 200
10 e 300 rpm durante a fase de batelada e é aumentada para até 1000 rpm no final da fase de alimentação em batelada. A concentração de oxigênio dissolvido é mantida em valores

entre uma saturação de 30 e 40% usando um controlador de gás. Quando a densidade óptica atinge um valor entre três e cinco, a alimentação em batelada é iniciada com uma taxa de fluxo inicial entre 0,3 e 0,5 ml/h e um aumento progressivo até valores de taxa de fluxo entre 2,5 e 3,5 ml/h. Nesse ponto, a taxa de fluxo é mantida constante durante 24 a 48 horas. O meio da alimentação é baseado em meio mínimo contendo glicose em concentrações entre 300 e 500 g/l.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para o preparo de uma cepa evoluída de microorganismo para a produção de 1,2-propanodiol a partir de uma fonte de carbono, o referido método **caracterizado**

5 **pelo** fato de compreender:

- crescimento de uma cepa inicial sob pressão de seleção em um meio de crescimento apropriado, a referida cepa bacteriana compreendendo uma atenuação da expressão do gene *tpiA* e uma atenuação da expressão de pelo menos um

10 gene envolvido na conversão de metilglioxal em lactato, de forma a promover a evolução na referida cepa inicial, então

- seleção e isolamento da cepa evoluída tendo uma taxa de produção aumentada de 1,2-propanodiol, então

15 - reconstrução de um gene *tpiA* funcional na cepa evoluída.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que o gene envolvido na conversão de metilglioxal em lactato é selecionado do grupo consistindo de: *gloA*, *aldA* e *aldB* e combinações dos mesmos.

20 3. Método, de acordo com as reivindicações 1 a 2, **caracterizado pelo** fato de que a cepa inicial compreende, além disso, a atenuação da expressão de pelo menos um dos genes selecionados dentre o grupo consistindo de *IdhA*, *pflA*, *pflF*, *adhE*, *edd* e *eda*.

4. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizado pelo** fato de que a cepa inicial compreende, além disso, a atenuação de pelo menos um gene selecionado dentre o grupo consistindo de *arcA* e *ndh*.

5. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizado pelo** fato de que a cepa evoluída é selecionada e isolada com base em sua taxa de produção de 1,2-propanodiol, aumentada em pelo menos 20% comparado com a taxa de produção da cepa inicial.

6. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizado pelo** fato de que a cepa inicial é selecionada do grupo consistindo de bactérias, levedos e fungos.

7. Método, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado pelo** fato de que a cepa inicial é selecionada do grupo consistindo de Enterobacteriaceae, Bacillaceae, Clostridiaceae, Streptomycetaceae e Corynebacteriaceae.

8. Método, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado pelo** fato de que a cepa inicial é *Escherichia coli* ou *Clostridium acetobutylicum*.

9. Cepa evoluída de microorganismo **caracterizada pelo** fato de ser obtida através do método conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 8.

10. Cepa evoluída, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizada pelo** fato de que a atividade de desidrogenase de gliceraldeído-3-fosfato é atenuada.

11. Cepa evoluída, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizada pelo** fato de que a expressão do gene *gapA* é atenuada.

12. Cepa evoluída, de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 11, **caracterizada pelo** fato de que a eficiência da importação de açúcar é aumentada.

13. Cepa evoluída, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizada pelo** fato de que o sistema de importação de açúcar independente de fosfoenol piruvato é usado.

14. Cepa evoluída, de acordo com a reivindicação 13, **caracterizada pelo** fato de que a expressão de pelo menos um gene selecionado dentre *galP* e *glk* é aumentada.

15. Cepa evoluída, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizada pelo** fato de que a eficiência do sistema de açúcar-fosfotransferase é aprimorada através de aumento da disponibilidade do metabólito fosfoenol piruvato.

16. Cepa evoluída, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizada pelo** fato de que a atividade de pelo menos uma quinase de piruvato é atenuada.

17. Cepa evoluída, de acordo com a reivindicação 16, **caracterizada pelo** fato de que a expressão de pelo menos um

gene selecionado dentre *pykA* e *pykF* é atenuada.

18. Cepa evoluída, de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 17, **caracterizada pelo** fato de que a atividade de sintase de fosfoenol piruvato é aumentada.

5 19. Cepa evoluída, de acordo com a reivindicação 18, **caracterizada pelo** fato de que a expressão do gene *ppsA* é aumentada.

20. Cepa evoluída, de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 19, **caracterizada pelo** fato de que a
10 enzima que favorece o metabolismo de piruvato em acetil-CoA tem uma menor sensibilidade à inibição pelo NADH do que a enzima não modificada.

21. Cepa evoluída, de acordo com a reivindicação 20, **caracterizada pelo** fato de que o gene *lpd* tem uma mutação
15 de ponto que leva a uma substituição de alanina por valina.

22. Cepa evoluída, de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 21, **caracterizada pelo** fato de que a atividade de pelo menos uma enzima envolvida na síntese de acetato é atenuada.

20 23. Cepa evoluída, de acordo com a reivindicação 22, **caracterizada pelo** fato de que a expressão de pelo menos um gene selecionado dentre *ackA*, *pta*, *poxB* é atenuada.

24. Método para preparo de 1,2-propanodiol **caracterizado pelo** fato de que uma cepa evoluída conforme definida em

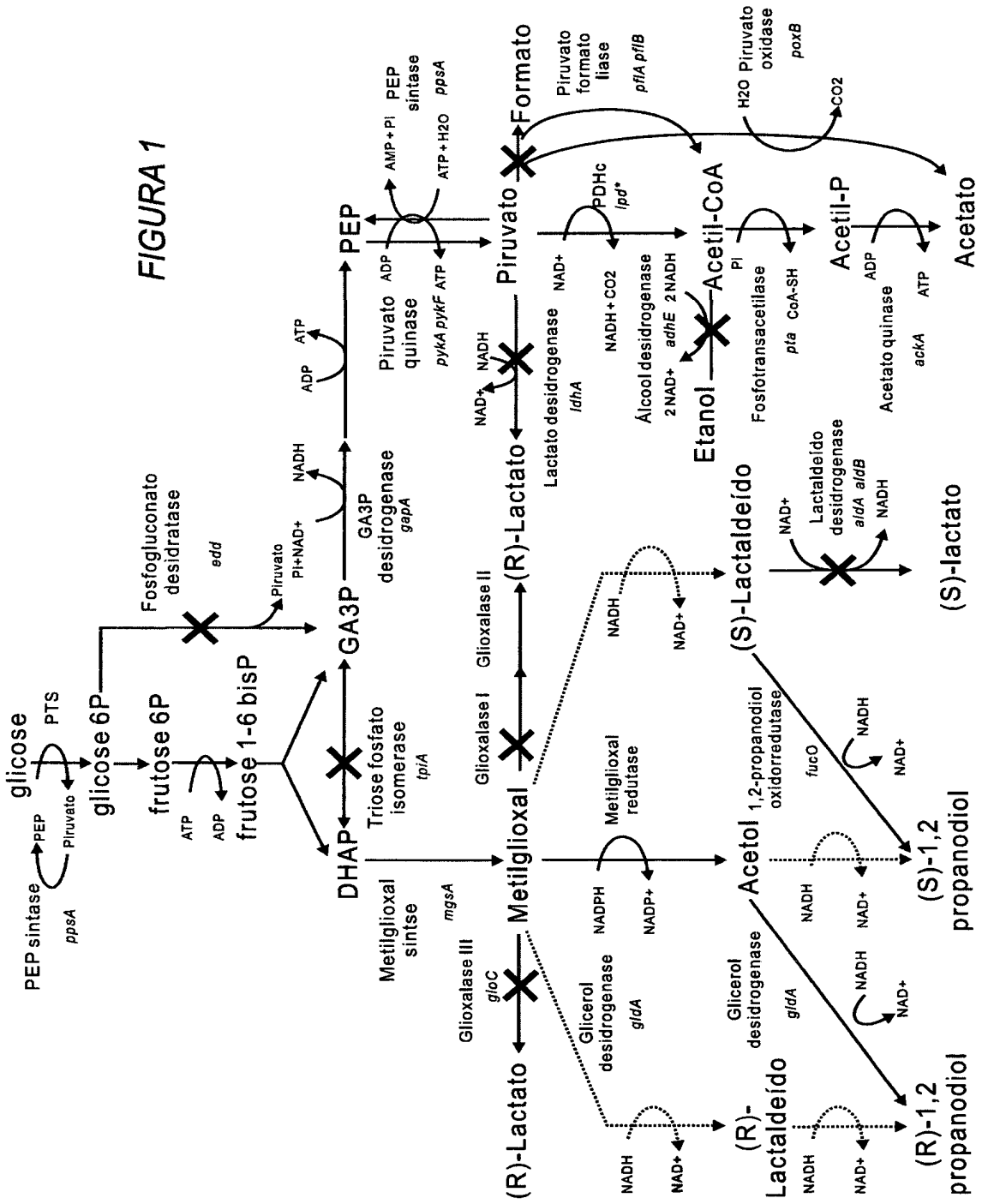
qualquer uma das reivindicações 9 a 23 é crescida em um meio de crescimento apropriado contendo uma fonte de carbono e o 1,2-propanodiol produzido é recuperado.

25. Método, de acordo com a reivindicação 24, **caracterizado**
5 **pelo** fato de que uma cepa evoluída de *Escherichia coli* é crescida em um meio de crescimento apropriado contendo uma fonte de carbono simples e o 1,2-propanodiol produzido é recuperado.

26. Método, de acordo com a reivindicação 24, **caracterizado**
10 **pelo** fato de que uma cepa evoluída de *Clostridium acetobutylicum* é crescida em um meio de crescimento apropriado contendo uma fonte de carbono simples ou complexa e o 1,2-propanodiol produzido é recuperado.

27. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações
15 24 a 26, **caracterizado pelo** fato de que o 1,2-propanodiol recuperado é ainda purificado.

FIGURA 1



Resumo da Patente de Invenção para **"NOVOS MICROORGANISMOS PARA A PRODUÇÃO DE 1,2-PROPANODIOL OBTIDOS ATRAVÉS DE UMA COMBINAÇÃO DE EVOLUÇÃO E DESIGN RACIONAL"**

A presente invenção se refere a um novo método
5 combinando evolução e design racional para o preparo de uma cepa de microorganismo para a produção de 1,2-propanodiol a partir de uma fonte de carbono. O referido método compreende:

- crescimento de uma cepa inicial sob pressão de
10 seleção em um meio de crescimento apropriado, a referida cepa bacteriana inicial compreendendo uma atenuação da expressão de pelo menos um gene envolvido na conversão de metilglioxal em lactato, de forma a promover a evolução na referida cepa inicial,

15 - então, seleção e isolamento da cepa evoluída tendo uma taxa de produção de 1,2-propanodiol aumentada,

- então, reconstrução de um gene tpiA funcional na cepa evoluída.

A presente invenção também se refere à cepa evoluída
20 tal como obtido que pode, além disso, ser geneticamente modificada de forma a otimizar a conversão de uma fonte de carbono em 1,2-propanodiol sem subprodutos e com o melhor rendimento possível.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> METABOLIC EXPLORER
 <120> Novos microorganismos para a produção de 1,2-propanodiol obtidos através de uma combinação de evolução e designs racional
 <130> D24916
 <150> PCT/IB2007/001680
 <151> 2007-03-23
 <160> 56
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleotídeo
 <400> 1
 ggtgatgata gttatcgccg 20
 <210> 2
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> artificial
 <220>
 <223> Oligonucleotídeo
 <400> 2
 cgtgccatcg acagcagtc 20
 <210> 3
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> artificial
 <220>
 <223> Oligonucleotídeo
 <400> 3
 agacattaaa aatatacgtg cagctacccg 30
 <210> 4
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> artificial
 <220>
 <223> Oligonucleotídeo
 <400> 4

gtgaaagctg acaacccttt tgatctttta

30

<210> 5
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> Oligonucleotideo

<400> 5
 ggctcattgc accaccatcc ag

22

<210> 6
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> Oligonucleotideo

<400> 6
 gaaaagacgc gctgacaata cgcc

24

<210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> Oligonucleotideo

<400> 7
 gccatcagca ggcttagccg

20

<210> 8
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> Oligonucleotideo

<400> 8
 gggatattgtg gcatgttttaa ccg

23

<210> 9
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> Oligonucleotideo

<400> 9
 gaagtggtcg atgccgggat tgaagaatgg g

31

<210> 10
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> artificial

 <220>
 <223> Oligonucleotideo

 <400> 10
 gggttacggtt tcagtgaggc gcgttctgcg g 31

<210> 11
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> artificial

 <220>
 <223> Oligonucleotideo

 <400> 11
 tgcagcggcg cacgatggcg acgttcggc g 31

<210> 12
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> artificial

 <220>
 <223> Oligonucleotideo

 <400> 12
 cacgatgacg accattcatg cctatactgg c 31

<210> 13
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> artificial

 <220>
 <223> Oligonucleotideo

 <400> 13
 catatttccc tcaaagaata taaaaagaa caattaacgc 40

<210> 14
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> artificial

 <220>
 <223> Oligonucleotideo

 <400> 14
 tatgttcacg cgatggcgca ccagctggcg g 31

<210> 15
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Oligonucleotideo

<400> 15
ccccggaatc agaggaatag tccc 24

<210> 16
<211> 29
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Oligonucleotideo

<400> 16
gggtagactc cattactgag gcgtgggcg 29

<210> 17
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Oligonucleotideo

<400> 17
gccatcagca ggcttagcgc 20

<210> 18
<211> 23
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Oligonucleotideo

<400> 18
gggtattgtg gcatgtttaa ccg 23

<210> 19
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Oligonucleotideo

<400> 19
cgacaattgg attcaccacg 20

<210> 20
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> Oligonucleotideo

<400> 20
 gcggtattga aaggttggtg c 21

<210> 21
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> Oligonucleotideo

<400> 21
 ccgtgagaag aatcgcgatc g 21

<210> 22
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> Oligonucleotideo

<400> 22
 gcgtagtcgt gtaagtatcg c 21

<210> 23
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> Oligonucleotideo

<400> 23
 catttccggt ggtgcgattg c 21

<210> 24
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> Oligonucleotideo

<400> 24
 gccacagccg gaatcatact tggtttggg 29

<210> 25

<211> 29
 <212> DNA
 <213> artificial

 <220>
 <223> Oligonucleotideo

 <400> 25
 cgtaacacc aacttcgtcc catttcagg 29

<210> 26
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> artificial

 <220>
 <223> Oligonucleotideo

 <400> 26
 ggcaattacc ctgcacgtac cgg 23

<210> 27
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> artificial

 <220>
 <223> Oligonucleotideo

 <400> 27
 ccgatggatg atctgttaga ggcgg 25

<210> 28
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> artificial

 <220>
 <223> Oligonucleotideo

 <400> 28
 gcgtaacctt ttccctggaa cg 22

<210> 29
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> artificial

 <220>
 <223> Oligonucleotideo

 <400> 29
 gcgttgctgg agcaacctgc cagc 24

<210> 30
 <211> 20

<212> DNA
 <213> artificial

 <220>
 <223> Oligonucleotideo

 <400> 30
 gcatgggtaa acttaaggcg 20

 <210> 31
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> artificial

 <220>
 <223> Oligonucleotideo

 <400> 31
 taatcaccaa cgtatcgggc 20

 <210> 32
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> artificial

 <220>
 <223> Oligonucleotideo

 <400> 32
 cgcggcttgg tcgggtaacg g 21

 <210> 33
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> artificial

 <220>
 <223> Oligonucleotideo

 <400> 33
 tcgggctatt taaccgttag tgcc 24

 <210> 34
 <211> 100
 <212> DNA
 <213> artificial

 <220>
 <223> Oligonucleotideo

 <400> 34
 gaaactcgcc gtttatagca caaaacagta cgacaagaag tacctgcaac aggtgaacga 60
 gtcctttggc tttagctgg ttaggctgg agctgcttgc 100

 <210> 35

<211> 101
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> Oligonucleotideo

<400> 35
 ttaaaccagt tcgttcgggc aggtttcgcc tttttccaga ttgcttaagt tttgcagcgt 60
 agtctgagaa atactggtca gcatatgaat atcctcctta g 101

<210> 36
 <211> 98
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> Oligonucleotideo

<400> 36
 ccccgacat tcttatcggt gaagacgagt tggtaacacg caacacgttg aaaagtattt 60
 tcgaagcgga aggctatgtg taggctggag ctgcttcg 98

<210> 37
 <211> 99
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> Oligonucleotideo

<400> 37
 ccagatcacc gcagaagcga taaccttcac cgtgaatggt ggcgatgatt tccggcgat 60
 ccggcgtaga ttcgaaatgc atatgaatat cctccttag 99

<210> 38
 <211> 99
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> Oligonucleotideo

<400> 38
 ctctcacaaa ttcgctcaaa taataacaa taaactctgt tttttgatct caccgggtaa 60
 agtcgcctat cttttcagct gtaggctgga gctgcttcg 99

<210> 39
 <211> 100
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>

<223> Oligonucleotideo

<400> 39

gcaacttcaa acgcggacgg ataacgcggt taatactccc caccagcatc attaatccgg 60
 ttttaaagta accatgcagc catatgaata tcttccttag 100

<210> 40

<211> 124

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> Oligonucleotideo

<400> 40

ggggctgacc ttcgctgttg aaccgattaa gctggcgcta tctgaatcgc ttgaaggttt 60
 gaataaatga tcacactggc tcaccttcgg gtgggccttt ctgccatatg aatatactcc 120
 ttag 124

<210> 41

<211> 106

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> Oligonucleotideo

<400> 41

gcgaataaag gaagatggcc gccccgcagg gcagcaggtc tgtgaaacag tatagagatt 60
 catcggcaca aaggctttgc tttttgtgta ggctggagct gcttcg 106

<210> 42

<211> 100

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> Oligonucleotideo

<400> 42

agtcatatat tccaccagct atttgtagt gaataaaagc cacacattat tcgagccgga 60
 tgattaatag tcaacagctc tgtaggctgg agctgcttcg 100

<210> 43

<211> 79

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> Oligonucleotideo

<400> 43

gctcacatta cgtgactgat tctaacaaaa cattaacacc aactggcaaa attttgcccc 60
 atatgaatat cctccttag 79

<210> 44
 <211> 101
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> Oligonucleotideo

<400> 44
 cgcgcgcggt gccaacgttg tacgtatgaa cttttctcac ggctcgctg aagatcacia 60
 aatgcgcgcg gataaagttc gtgtaggctg gagctgcttc g 101

<210> 45
 <211> 101
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> Oligonucleotideo

<400> 45
 cgccgcatcc ggcaacgtac ttactctacc gttaaatac gcgtgggtatt agtagaacc 60
 acgggtactca tcacgtcgcc ccatatgaat atcctcctta g 101

<210> 46
 <211> 98
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> Oligonucleotideo

<400> 46
 cccatccttc tcaacttaaa gactaagact gtcattgaaaa agacaaaaat tgtttgcacc 60
 atcggaccga aaaccgaatg taggctggag ctgcttcg 98

<210> 47
 <211> 99
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> Oligonucleotideo

<400> 47
 ggacgtgaac agatgcggtg ttagtagtgc cgctcggtac cagtgcacca gaaaccataa 60
 ctacaacgtc acotttgtgc atatgaatat cctccttag 99

<210> 48
 <211> 100
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> Oligonucleotideo

<400> 48
 cgagtaagtt agtactgggt ctgaactgcg gtagttcttc actgaaattt gccatcatcg 60
 atgcagtaaa tgggtgaagag tgtaggctgg agctgcttcg 100

<210> 49
 <211> 97
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> Oligonucleotideo

<400> 49
 gctgctgtgc agactgaatc gcagtcagcg cgatggtgta gacgatatcg tcaaccagtg 60
 cgccacggga caggtcgcat atgaatatcc tccttag 97

<210> 50
 <211> 99
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> Oligonucleotideo

<400> 50
 ccttagccag tttgttttcg ccagttcgat cacttcatca ccgcgtccgc tgatgattgc 60
 gcgcagcata tacaggctgc atatgaatat cctccttag 99

<210> 51
 <211> 102
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> Oligonucleotideo

<400> 51
 cggttgacgc ttatatcgcc aaaacactcg aatcggcagg ggtgaaacgc atctggggag 60
 tcacaggcga ctctctgaac ggtgtaggct ggagctgctt cg 102

<210> 52
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> promotor sintético

<400> 52
 gagctgttga cgattaatca tccggctcga ataatgtgtg g 41

<210> 53
 <211> 65
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> Oligonucleotideo

<400> 53
 cctttttattc actaacaaat agctgggtgga atatatgtcc aacaatggct cgtcaccgct 60
 ggtgc 65

<210> 54
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> Oligonucleotideo

<400> 54
 aatcgcaagc ttgaatccgg ttatttcttc agttcagcca ggc 43

<210> 55
 <211> 65
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> Oligonucleotideo

<400> 55
 gcaccagcgg tgacgagcca ttgttggaaca tatattccac cagctatttg ttagtgaata 60
 aaagg 65

<210> 56
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> Oligonucleotideo

<400> 56
 acgtcccggg caagcccaaa ggaagagtga ggc 33