



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

(11) PI 0314498-4 B1



(22) Data do Depósito: 06/10/2003

(45) Data de Concessão: 20/08/2019

(54) Título: ESCHERICHIA COLI TRANSGÊNICA E MÉTODO PARA A BIOPRODUÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL

(51) Int.Cl.: C12N 15/54; C12N 1/21; C12P 7/18.

(30) Prioridade Unionista: 04/10/2002 US 60/416,192.

(73) Titular(es): E.I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY; GENENCOR INTERNATIONAL, INC..

(72) Inventor(es): MARGUERITE A. CERVIN; PHILLIPE SOUCAILLE; FERNANDO VALLE.

(86) Pedido PCT: PCT US2003031805 de 06/10/2003

(87) Publicação PCT: WO 2004/033646 de 22/04/2004

(85) Data do Início da Fase Nacional: 30/03/2005

(57) Resumo: "LINHAGENS DE E.COLI E MÉTODO PARA A BIOPRODUÇÃO DE 1,3PROPANODIOL". A presente invenção fornece um microorganismo útil para a produção biológica de 1,3-propanodiol a partir de fonte de carbono fermentável em rendimento mais alto que o anteriormente conhecido. A complexidade das necessidades de cofator necessita do uso de um catalisador de célula inteira para um processo industrial que utiliza esta sequência de reação para produzir 1,3-propanodiol. A presente invenção fornece um microorganismo com rupturas em genes especificados e alterações nos níveis de expressão de genes especificados que é útil em processo de rendimento superior para a produção de 1,3-propanodiol.

“*ESCHERICHIA COLI* TRANSGÊNICA E MÉTODO PARA A BIOPRODUÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL”

CAMPO DA INVENÇÃO

[0001] A presente invenção refere-se a um processo para a bioconversão de uma fonte de carbono fermentável em 1,3-propanodiol por um único microorganismo.

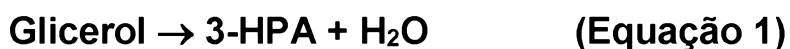
ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[0002] O 1,3-propanodiol é um monômero que possui uma utilidade potencial na produção de fibras de poliéster e na fabricação de poliuretanos e compostos cíclicos.

[0003] É conhecida uma série de vias químicas para 1,3-propanodiol. Óxido de etileno, por exemplo, pode ser convertido em 1,3-propanodiol sobre um catalisador na presença de fosfina, água, monóxido de carbono, hidrogênio e um ácido, através da hidratação de fases de solução catalítica de acroleína seguida por redução, ou de compostos tais como glicerol, reagidos na presença de monóxido de carbono e hidrogênio sobre catalisadores que contêm átomos do grupo VIII da tabela periódica. Embora seja possível gerar 1,3-propanodiol através destes métodos, eles são caros e geram correntes residuais que contêm poluentes ambientais.

[0004] Sabe-se há mais de um século que o 1,3-propanodiol pode ser produzido a partir da fermentação de glicerol. Linhagens de bactérias capazes de produzir 1,3-propanodiol foram descobertas, por exemplo, nos grupos *Citrobacter*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Ilyobacter*, *Klebsiella*, *Lactobacillus* e *Pelobacter*. Em cada caso estudado, glicerol é convertido em 1,3-propanodiol em uma seqüência reacional catalisada por enzimas em duas etapas. Na primeira etapa, uma desidratase catalisa a conversão de glicerol em 3-hidroxiopropionaldeído (3-HPA) e água, Equação 1. Na segunda etapa, 3-HPA é reduzido em 1,3-propanodiol por uma oxidoreductase ligada a NAD⁺,

Equação 2. O 1,3-propanodiol não é metabolizado adicionalmente e, como resultado:



acumula-se no meio. A reação geral consome um equivalente de redução na forma de um cofator, β -nicotinamida adenina-dinucleotídeo reduzida (NADH), que é oxidado em nicotinamida adenina-dinucleotídeo (NAD⁺).

[0005] Em *Klebsiella pneumonia*, *Citrobacter freundii* e *Clostridium pasteurianum*, os genes que codificam as três subunidades estruturais de glicerol desidratase (*dhaB1-3* ou *dhaB*, *C* e *E*) estão localizados ao lado de um gene que codifica uma 1,3-propanodiol oxidoreductase específica (*dhaT*). Embora a organização gênica difira um pouco entre esses microorganismos, estes genes são reunidos em um grupo que também compreende *orfX* e *orfZ* (genes que codificam um fator de reativação de desidratase para glicerol desidratase), bem como *orfY* e *orfW* (genes de função desconhecida). As 1,3-propanodiol oxidoreductases específicas (*dhaTs*) destes microorganismos são conhecidas por pertencerem à família de álcool desidrogenases do tipo III; cada qual exibe um motivo de ligação férrica conservado e possui preferência para a interconversão ligada por NAD⁺/NADH de 1,3-propanodiol e 3-HPA. Entretanto, a interconversão ligada por NAD⁺/NADH de 1,3-propanodiol e 3-HPA também é catalisada por álcool desidrogenases que não são ligadas especificamente a enzimas desidratase (tais como álcool desidrogenases de levedura de padaria e fígado de cavalo (E.C. 1.1.1.1)), embora com parâmetros cinéticos menos eficientes. Glicerol desidratase (E.C. 4.2.1.30) e diol-[1,2-propanodiol]-desidratase (E.C. 4.2.1.28) são enzimas relacionadas mas distintas que são codificadas por genes distintos. Os

genes de diol desidratase de *Klebsiella oxytoca* e *Salmonella typhimurium* são similares a genes de glicerol desidratase e são reunidos em um grupo que compreende genes análogos a *orfX* e *orfZ* (Daniel et al., *FEMS Microbiol. Rev.* 22, 553 (1999); Toraya e Mori, *J. Biol. Chem.* 274, 3372 (1999); GenBank AF 026270).

[0006] A produção de 1,3-propanodiol a partir de glicerol, geralmente, é realizada sob condições anaeróbicas utilizando-se glicerol como única fonte de carbono e na ausência de outros aceptores equivalentes redutores exógenos. Sob estas condições, por exemplo, em linhagens de *Citrobacter*, *Clostridium* e *Klebsiella*, opera-se uma via paralela para glicerol, que envolve em primeiro lugar a oxidação de glicerol em diidroxiacetona (DHA) por uma glicerol desidrogenase ligada por NAD⁺ (ou NADP⁺), Equação 3. O DHA, após fosforilação em fosfato de diidroxiacetona (DHAP) por uma DHA quinase (Equação 4):



torna-se disponível para biossíntese e para sustentar a geração de ATP através, por exemplo, de glicólise. Ao contrário da via de 1,3-propanodiol, esta via pode fornecer carbono e energia para a célula e produz em vez de consumir NADH.

[0007] Em *Klebsiella pneumoniae* e *Citrobacter freundii*, os genes que codificam as atividades funcionalmente ligadas de glicerol desidratase (*dhaB*), 1,3-propanodiol oxidoreductase (*dhaT*), glicerol desidrogenase (*dhaD*) e diidroxiacetona quinase (*dhaK*) são englobadas pelo regulon *dha*. O regulon *dha*, em *Klebsiella pneumoniae* e *Citrobacter freundii*, também engloba um gene que codifica uma proteína ativadora da transcrição (*dhaR*). Os regulons *dha* de *Citrobacter* e *Klebsiella* foram expressos em *Escherichia coli* e demonstraram converter glicerol em 1,3-propanodiol.

[0008] Nem os métodos químicos, nem biológicos, descritos acima para a produção de 1,3-propanodiol são apropriados para produção em escala industrial, pois os processos químicos apresentam uso intensivo de energia e os processos biológicos são limitados a título relativamente baixo do material de partida caro, o glicerol. Estas desvantagens poderão ser superadas com um método que exija baixa entrada de energia e material de partida barato, tal como carboidratos ou açúcares, ou através do aumento da eficiência metabólica de um processo de glicerol. O desenvolvimento de qualquer método exigirá a capacidade de manipular a maquinaria gênica responsável pela conversão de açúcares em glicerol e glicerol em 1,3-propanodiol.

[0009] Os processos biológicos de preparação de glicerol são conhecidos. A vasta maioria de produtores de glicerol são leveduras, mas também são conhecidas algumas bactérias, além de fungos e algas. Tanto bactérias quanto leveduras produzem glicerol através da conversão de glicose ou outros carboidratos através da via de frutose-1,6-bisfosfato da glicólise ou da via Embden Meyerhof Parnas. Diidroxiacetona Fosfato é convertido em glicerol-3-fosfato através da ação de glicerol-3-fosfato desidrogenase e glicerol-3-fosfato é convertido em glicerol através da ação de glicerol-3-fosfatase.

[0010] O gene codificador de glicerol-3-fosfato desidrogenase (DAR1, GPD1) foi clonado e seqüenciado a partir de *S. diastaticus* (Wang et al., *J. Bact.* 176, 7091-7095 (1994)). O gene DAR1 foi clonado em um vetor ponte e utilizado para transformar *E. coli*, onde a expressão produziu uma enzima ativa. Wang et al., (acima) reconhecem que DAR1 é regulado pelo ambiente osmótico celular, mas não sugerem como o gene poderá ser utilizado para aumentar a produção de 1,3-propanodiol em um microorganismo recombinante.

[0011] Outras enzimas de glicerol-3-fosfato desidrogenase foram

isoladas; por exemplo, sn-glicerol-3-fosfato desidrogenase foi clonado e seqüenciado a partir de *Saccharomyces cerevisiae* (Larason et al., *Mol. Microbiol.* 10, 1101 (1993)) e Albertyn et al., (*Mol. Cell. Biol.* 14, 4135 (1994)) ensinam a clonagem de GPD1 que codifica uma glicerol-3-fosfato desidrogenase a partir de *Saccharomyces cerevisiae*. Como Wang et al., (acima), tanto Albertyn et al., quanto Larason et al., reconhecem a osmo-sensibilidade da regulação deste gene, mas não sugerem como o gene poderá ser utilizado na produção de 1,3-propanodiol em um microorganismo recombinante.

[0012] Como ocorre com G3PDH, glicerol-3-fosfatase foi isolado a partir de *Saccharomyces cerevisiae* e a proteína identificada como sendo codificada pelos genes GPP1 e GPP2 (Norbeck et al., *J. Biol. Chem.* 271, 13875 (1996)). Como ocorre com os genes que codificam G3PDH, aparentemente GPP2 é osmossensível.

[0013] O documento WO 9634961 e Hernandez-Montalvo et al., (*Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57: 186-191 (2001)) descrevem linhagens de *E. coli* que possuem fenótipos menos “PTS” / mais glicose. A Patente EP 1.170.376 A1 descreve a deleção de um gene para NADH desidratase II para aumentar a eficiência de energia. O documento WO 2001016346 descreve a utilidade de “aldeído desidrogenase A” e “aldeído desidrogenase B” para a produção de ácido 3-hidroxipropiônico.

[0014] O documento WO 96/35796 (Patente US 5.686.276, da E.I. du Pont de Nemours and Company (“DuPont”)) descreve um método de produção de 1,3-propanodiol a partir de um substrato de carbono diferente de glicerol ou diidroxiacetona (especialmente, por exemplo, glicose), utilizando um único microorganismo que compreende uma atividade de desidratase. O documento WO 99/28480 (DuPont) descreve um método similar com vantagens derivadas da expressão de atividades

endógenas de uma ou ambas dentre glicerol-3-fosfato desidrogenase e glicerol-3-fosfato fosfatase, interrompendo ao mesmo tempo uma ou ambas as atividades endógenas de glicerol quinase e glicerol desidrogenase. O documento WO 98/21339 (Patente US 6.013.494, DuPont) descreve um processo de produção de 1,3-propanodiol utilizando um único microorganismo que compreende glicerol-3-fosfato desidrogenase exógena, glicerol-3-fosfato fosfatase, desidratase e 1,3-propanodiol oxidoreductase (por exemplo, *dhaT*). O documento WO 98/21341 (Patente US 6.136.576, DuPont) descreve um método de produção de 1,3-propanodiol que compreende um microorganismo recombinante que compreende adicionalmente uma desidratase e proteína X (identificada posteriormente como sendo um peptídeo de fator de reativação de desidratase). O documento WO 2001012833 (DuPont) descreve uma melhoria do processo em que um aumento significativo do título (gramas produzidos por litro) é obtido em virtude de atividade catalítica não-específica (diferenciada de 1,3-propanodiol oxidoreductase codificada por *dhaT*) para converter 3-hidroxi propionaldeído em 1,3-propanodiol. A Patente US 10/420587 (2003) (US 60/374931 (2002) DuPont) descreve vetores e plasmídeos úteis para a produção de 1,3-propanodiol. Os pedidos da DuPont são incorporados como referência ao presente relatório descritivo como se fossem descritos integralmente na presente invenção.

[0015] A produção biológica de 1,3-propanodiol requer glicerol como substrato intermediário para uma reação seqüencial de duas etapas na qual uma enzima desidratase (tipicamente uma desidratase dependente de coenzima B₁₂) converte glicerol em 3-hidroxi propionaldeído, que é reduzido em seguida em 1,3-propanodiol por uma oxidoreductase dependente de NADH⁻ (ou NADPH⁻). A complexidade das necessidades de cofator necessita do uso de um catalisador de células inteiras para um

processo industrial que utilize esta seqüência reacional para a produção de 1,3-propanodiol.

[0016] Uma deficiência específica nos processos biológicos que causa a produção de 1,3-propanodiol a partir de glicose tem sido o baixo rendimento do produto atingido através de fermentação. O documento WO 2001012833 (DuPont) descreve rendimentos em peso de 1,3-propanodiol a partir de glicose na faixa de 24% e 35%. O problema que permanece a ser resolvido é como produzir biologicamente 1,3-propanodiol, com alto rendimento e por um único microorganismo, a partir de um substrato de carbono barato, tal como glicose ou outros açúcares.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

[0017] Os depositantes solucionaram o problema indicado. A presente invenção fornece a bioconversão de uma fonte de carbono fermentável em 1,3-propanodiol em rendimento mais alto que o obtido anteriormente e com o uso de um único microorganismo. O rendimento obtido é superior a 35% e, preferencialmente, superior a 40%. Glicose é utilizada como substrato modelo e *Eschericia coli* é utilizada como microorganismo hospedeiro modelo com as modificações genéticas úteis e interrupções detalhadas na presente invenção.

[0018] Os depositantes forneceram uma linhagem de *E. coli* que compreende:

a) um sistema de fosfoenolpiruvato-glicose fosfotransferase endógeno interrompido que evita a expressão de proteínas do sistema PEP-glicose fosfotransferase ativa;

b) um gene *galP* endógeno suprarregulado que codifica um cotransportador de prótons-galactose activo;

c) um gene *glK* endógeno suprarregulado que codifica glicoquinase ativa; e

d) um gene *gapA* endógeno infrarregulado que codifica

gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase ativa.

[0019] Os depositantes também forneceram uma linhagem de *E. coli* descrita acima, em que o sistema de fosfoenolpiruvato-glicose fosfotransferase endógeno interrompido compreende um ou mais dentre:

a1) um gene *ptsH* endógeno interrompido que evita a expressão de proteína fosfotransportadora ativa;

a2) um gene *ptsI* endógeno interrompido que evita a expressão de fosfoenolpiruvato-proteína fosfotransferase ativa; e

a3) um gene *crr* endógeno interrompido que evita a expressão de componente IIA específico de glicose ativo.

[0020] As realizações de *E. coli* descritas acima podem compreender adicionalmente um ou mais dentre:

e) um gene *arcA* endógeno interrompido que evita a expressão de proteína de controle da respiração aeróbica ativa;

f) um gene *ppc* endógeno suprarregulado que codifica fosfoenolpiruvato carboxilase ativa;

g) um gene *btuR* endógeno suprarregulado que codifica cob(I)alamina adenosiltransferase ativa; e

h) um gene *yqhD* suprarregulado que codifica álcool desidrogenase ativa.

As realizações de *E. coli* descritas acima podem compreender adicionalmente um ou mais dentre:

i) um gene *mgsA* endógeno interrompido que evita a expressão de metilglioal sintase ativa;

j) um gene *ackA* endógeno interrompido que evita a expressão de acetato quinase ativa;

k) um gene *pta* endógeno interrompido que evita a expressão de fosfotrasacetilase ativa;

l) um gene *aldA* endógeno interrompido que evita a expressão de aldeído desidrogenase A ativa; e

m) um gene *aldB* endógeno interrompido que evita a expressão de aldeído desidrogenase B ativa.

[0021] As realizações de *E. coli* descritas acima podem compreender adicionalmente um ou mais dentre:

n) um gene *edd* endógeno interrompido que evita a expressão de fosfogliconato desidratase ativa;

o) um gene *glpK* endógeno interrompido que evita a expressão de glicerol quinase ativa; e

p) um gene *glpA* endógeno interrompido que evita a expressão de glicerol desidrogenase dependente de NADH ativa.

[0022] Além disso, o 1,3-propanodiol pode ser bioproduzido através do contato de uma linhagem de *E. coli* descrita na presente invenção com um substrato de carbono apropriado, tal como glicose, sob condições adequadas para fermentação. Adicionalmente, o 1,3-propanodiol pode ser bioproduzido através do contato de uma linhagem de *E. coli* descrita na presente invenção, em que a linhagem de *E. coli* compreende adicionalmente uma ativa:

(i) glicerol-3-fosfato desidrogenase;

(ii) glicerol-3-fosfatase;

(iii) desidratase; e

(iv) atividade de reativação de desidratase;

com um substrato de carbono apropriado sob condições adequadas.

[0023] Além disso, qualquer das realizações descritas acima pode também incluir as construções pSYCO101, pSYCO103, pSYCO106, pSYCO109 ou suas seqüências de nucleotídeos correspondentes SEQ ID

Nº 65, 66, 67 ou 68.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

DESCRIÇÕES DA LISTAGEM DE SEQUÊNCIA E DOS DEPÓSITOS BIOLÓGICOS

[0024] A presente invenção pode ser compreendida mais completamente a partir do relatório descritivo detalhado a seguir, da Figura 1, da listagem de seqüências anexa e descrições e dos depósitos biológicos que fazem parte do presente pedido.

[0025] A Figura 1 exibe a produção de 1,3-propanodiol comparada entre duas fermentações conduzidas essencialmente conforme descrito em *MÉTODOS GERAIS*. Em um caso, a linhagem utilizada foi FMP::Km/pSYCO103. No outro caso, a linhagem utilizada foi FMP/pSYCO103.

[0026] As 68 descrições de seqüências e a listagem de seqüências anexa ao presente cumprem com as regras que regem as descrições de seqüências de aminoácidos e/ou nucleotídeos em pedidos de patente conforme descrito em 37 C.F.R. § 1.821-1.825 (*Requirements for Patent Applications Containing Nucleotide Sequences and/or Amino Acid Sequence Disclosures - the Sequence Rules*) e serão consistentes com a Norma ST2.5 (1998) da Organização Mundial da Propriedade Intelectual (OMPI) e os requerimentos de listagem de seqüências do EPO e PCT (Regras 5.2 e 49.5 (a-bis) e Capítulo 208 e Anexo C das Instruções Administrativas). As Descrições de Seqüências contêm o código de uma letra para caracteres de seqüência de nucleotídeos e os códigos de três letras para aminoácidos, conforme definido em conformidade com as normas IUPAC-IYUB descritos em *Nucleic Acids Res.* 13, 3021-3030 (1985) e no *Biochemical Journal* 219, 345-373 (1984), que são incorporados à presente invenção como referência.

[0027] SEQ ID Nº 1 é a seqüência de nucleotídeos parcial de pLoxCat27 que codifica o cassete *loxP511-Cat-loxP511*.

[0028] SEQ ID N° 2 e 3 são primers de oligonucleotídeos utilizados para construir a interrupção de *ArcA*.

[0029] SEQ ID N° 4 e 5 são primers de oligonucleotídeos utilizados para confirmar a interrupção de *ArcA*.

[0030] SEQ ID N° 6 é a sequência de nucleotídeos parcial de pLoxCat1 que codifica o cassete de *loxP*-Cat-*loxP*.

[0031] SEQ ID N° 7 e 8 são primers de oligonucleotídeos utilizados para construir pR6KgalP, o plasmídeo modelo para a substituição de promotor *trc* do promotor *galP* cromossômico.

[0032] SEQ ID N° 9 e 10 são primers de oligonucleotídeos utilizados para construir pR6Kglk, o plasmídeo modelo para a substituição de promotor *trc* do promotor *glk* cromossômico.

[0033] SEQ ID N° 11 é a sequência de nucleotídeos do cassete *loxP*-Cat-*loxP*-Trc.

[0034] SEQ ID N° 12 e 13 são primers de oligonucleotídeos utilizados para confirmar a integração de SEQ ID N° 11 para substituição do promotor *galP* cromossômico.

[0035] SEQ ID N° 14 e 15 são primers de oligonucleotídeos utilizados para confirmar a integração de SEQ ID N° 11 para substituição do promotor *glk* cromossômico.

[0036] SEQ ID N° 16 e 17 são primers de oligonucleotídeos utilizados para construir a interrupção de *edd*.

[0037] SEQ ID N° 18 e 19 são primers de oligonucleotídeos utilizados para confirmar a interrupção de *edd*.

[0038] SEQ ID N° 20 é a sequência de nucleotídeos para o promotor *trc* selecionado que controla a expressão de *glk*.

[0039] SEQ ID N° 21 é a sequência de nucleotídeos parcial para o promotor *trc* padrão.

[0040] SEQ ID N° 22 e 23 são os primers de oligonucleotídeos utilizados para a amplificação de *gapA*.

[0041] SEQ ID N° 24 e 25 são os primers de oligonucleotídeos utilizados para alterar o códon de início de *gapA* para GTG.

[0042] SEQ ID N° 26 e 27 são os primers de oligonucleotídeos utilizados para alterar o códon de início de *gapA* para TTG.

[0043] SEQ ID N° 28 é a seqüência de nucleotídeos para o promotor 1.5 GI curto.

[0044] SEQ ID N° 29 e 30 são os primers de oligonucleotídeos utilizados para substituição do promotor *gapA* cromossômico com o promotor 1.5 GI curto.

[0045] SEQ ID N° 31 é a seqüência de nucleotídeos para o promotor 1.20 GI curto.

[0046] SEQ ID N° 32 é a seqüência de nucleotídeos para o promotor 1.6 GI curto.

[0047] SEQ ID N° 33 e 34 são primers de oligonucleotídeos utilizados para substituição do promotor *gapA* cromossômico com o promotor 1.20 GI curto.

[0048] SEQ ID N° 35 é o primer de oligonucleotídeo com SEQ ID N° 33 que é utilizado para substituição do promotor *gapA* cromossômico com o promotor 1.6 GI curto.

[0049] SEQ ID N° 36 e 37 são primers de oligonucleotídeos utilizados para construir a interrupção de *mgsA*.

[0050] SEQ ID N° 38 e 39 são primers de oligonucleotídeos utilizados para confirmar a interrupção de *mgsA*.

[0051] SEQ ID N° 40 e 41 são primers de oligonucleotídeos utilizados para substituição do promotor *ppc* cromossômico com o promotor 1.6 GI curto.

[0052] SEQ ID N° 42 é um primer de oligonucleotídeo utilizado para confirmar a substituição do promotor *ppc*.

[0053] SEQ ID N° 43 e 44 são primers de oligonucleotídeos utilizados para substituição do promotor *yciK-btuR* cromossômico com o promotor 1.6 GI curto.

[0054] SEQ ID N° 45 e 46 são primers de oligonucleotídeos utilizados para confirmar a substituição do promotor *yciK-btuR*.

[0055] SEQ ID N° 47 e 48 são primers de oligonucleotídeos utilizados para substituição do promotor *yqhD* cromossômico com o promotor 1.6 GI curto.

[0056] SEQ ID N° 49 é um primer de oligonucleotídeo utilizado para confirmar a substituição do promotor *yqhD*.

[0057] SEQ ID N° 50 e 51 são primers de oligonucleotídeos utilizados para construir a interrupção de *pta-ackA*.

[0058] SEQ ID N° 52 e 53 são primers de oligonucleotídeos utilizados para confirmar a interrupção de *pta-ackA*.

[0059] SEQ ID N° 54 e 55 são primers de oligonucleotídeos utilizados para construir a interrupção de *ptsHIcrr*.

[0060] SEQ ID N° 56 é um primer de oligonucleotídeo utilizado para confirmar a interrupção de *ptsHIcrr*.

[0061] SEQ ID N° 57 e 58 são primers de oligonucleotídeos utilizados para construir a interrupção de *aldA*.

[0062] SEQ ID N° 59 e 60 são primers de oligonucleotídeos utilizados para confirmar a interrupção de *aldA*.

[0063] SEQ ID N° 61 e 62 são primers de oligonucleotídeos utilizados para construir a interrupção de *aldB*.

[0064] SEQ ID N° 63 e 64 são primers de oligonucleotídeos utilizados para confirmar a interrupção de *aldB*.

[0065] SEQ ID N° 65 é a sequência de nucleotídeos para o plasmídeo pSYCO101.

[0066] SEQ ID N° 66 é a sequência de nucleotídeos para o plasmídeo pSYCO103.

[0067] SEQ ID N° 67 é a sequência de nucleotídeos para o plasmídeo pSYCO106.

[0068] SEQ ID N° 68 é a sequência de nucleotídeos para o plasmídeo pSYCO109.

[0069] Os depositantes fizeram os depósitos biológicos a seguir com base nos termos do Tratado de Budapeste sobre o Reconhecimento Internacional do Depósito de Microorganismos para o Propósito de Procedimentos de Patentes.

Identificação de referência do depositante	Designação do depositário internacional	Data do depósito
<i>E. coli</i> DH5 α transformado que contém uma parte do genoma de <i>Klebsiella</i> que codifica a enzima glicerol desidratase	ATCC 69789	18 de abril de 1995
<i>E. coli</i> DH5 α transformado que contém o cosmídeo pKP4 que contém uma parte do genoma de <i>Klebsiella</i> que codifica uma enzima diol desidratase	ATCC 69790	18 de abril de 1995
<i>E. coli</i> MSP33.6	ATCC 98598	25 de novembro de 1997
<i>E. coli</i> RJF10m mutante de <i>glpK</i>	ATCC 98597	25 de novembro de 1997
<i>Escherichia coli</i> : RJ8n	ATCC PTA4216	9 de abril de 2002
<i>Escherichia coli</i> : FMP ⁺ ::Km	ATCC PTA-4732	28 de setembro de 2002

[0070] O(s) depósito(s) será(ão) mantido(s) no depositário internacional indicado por pelo menos 30 anos e será(ão) disponibilizado(s) para o público mediante a concessão de uma patente que o(s) revele. A disponibilidade de um depósito não constitui licença de prática da presente invenção em derrogação dos direitos sobre patentes concedidos por ação governamental.

[0071] Da forma utilizada no presente, "ATCC" designa o

depositário internacional Coleção Norte-Americana de Culturas de Tipos localizado em 10801 University Blvd., Manassas VA 20110-2209, Estados Unidos. “ATCC N°” é o número de acesso a culturas em depósito junto à ATCC.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0072] A presente invenção refere-se a um processo aprimorado de bioconversão de uma fonte de carbono fermentável diretamente em 1,3-propanodiol, utilizando um único microorganismo. O método é caracterizado por um rendimento aprimorado de 1,3-propanodiol em níveis não obtidos anteriormente.

[0073] As linhagens hospedeiras de produção descritas foram elaboradas para maximizar a eficiência metabólica do processo através de incorporação de várias mutações deletérias que evitam a transformação de carbono em compostos não-produtivos. Contempla-se que transformações e mutações podem ser combinadas de forma a controlar atividades enzimáticas específicas para o aumento da produção de 1,3-propanodiol. Desta forma, encontra-se dentro do escopo da presente invenção antecipar modificações de um catalisador de célula inteira que geram um aumento da produção de 1,3-propanodiol.

TERMOS E DEFINIÇÕES

[0074] A presente invenção pode ser compreendida mais completamente em relação aos termos e definições a seguir, utilizados nas reivindicações e relatório descritivo.

GENES QUE SÃO DELETADOS

[0075] As expressões “NADH desidrogenase II”, “NDH II” e “Ndh” designam a NADH desidrogenase do tipo II, proteína que catalisou a conversão de ubiquinona-8 + NADH + H⁺ em ubiquinol-8 + NAD⁺. Típico de NADH desidrogenase II é EC 1.6.99.3. A NADH desidrogenase II é codificada por *ndh* em *E. coli*.

[0076] As expressões “proteína de controle de respiração

aeróbica” e “ArcA” designam uma proteína reguladora global. A proteína de controle de respiração aeróbica é codificada por *arcA* em *E. coli*.

[0077] As expressões “fosfogliconato desidratase” e “Edd” designam uma proteína que catalisou a conversão de 6-fosfo-gliconato em 2-ceto-3-deóxi-6-fosfo-gliconato + H₂O. Típico de fosfogliconato desidratase é EC 4.2.1.12. Fosfogliconato desidratase é codificada por *edd* em *E. coli*.

[0078] As expressões “proteína HPr fosfocondutora” e “PtsH” designam a proteína fosfocondutora codificada por *ptsH* em *E. coli*. As expressões “fosfoenolpiruvato-proteína fosfotransferase” e “PtsI” designam a fosfotransferase, EC 2.7.3.9, codificada por *ptsI* em *E. coli*. As expressões “sistema de PTS”, “componente IIA específico de glicose” e “Crr” designam EC 2.7.1.69, codificada por *crr* em *E. coli*. PtsH, PtsI e Crr compreendem o sistema PTS.

[0079] A expressão “sistema de fosfoenolpiruvato-açúcar fosfotransferase”, “sistema PTS” ou “PTS” designa o sistema de absorção de açúcar dependente de fosfoenolpiruvato.

[0080] As expressões “metilglioal sintase” e “MgsA” designam uma proteína que catalisou a conversão de diidróxi-acetona-fosfato em metilglioal + fosfato. Típico de metilglioal sintase é EC 4.2.3.3. Metilglioal sintase é codificada por *mgsA* em *E. coli*.

[0081] As expressões “aldeído desidrogenase A” e “AldA” designam uma proteína que catalisou a conversão de H₂O + NAD⁺ + aldeído em NADH + álcool. Típico de aldeído desidrogenase A é EC 1.2.1.22. Aldeído desidrogenase A é codificada por *aldA* em *E. coli*.

[0082] As expressões “aldeído desidrogenase B” e “AldB” designam uma proteína que catalisou a conversão de H₂O + NAD⁺ + aldeído em NADH + álcool. Típico de aldeído desidrogenase B é EC 1.2.1.22. Aldeído

desidrogenase B é codificada por *aldB* em *E. coli*.

GENES CUJA EXPRESSÃO FOI MODIFICADA

[0083] As expressões “cotransportador de prótons-galactose” e “GalP” designam uma proteína que catalisa o transporte de açúcar e um próton do periplasma para o citoplasma. A D-glicose é um substrato preferido para GalP. O cotransportador de prótons-galactose é codificado por *galP* em *E. coli*.

[0084] Os termos “glicoquinase” e “Glk” designam uma proteína que catalisa a conversão de D-glicose + ATP em glicose-6-fosfato + ADP. Típico de glicoquinase é EC 2.7.1.2. A glicoquinase é codificada por *glk* em *E. coli*.

[0085] As expressões “gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase” e “GapA” designam uma proteína que catalisa a conversão de gliceraldeído-3-fosfato + fosfato + NAD⁺ em 3-fosfo-D-gliceroil-fosfato + NADH + H⁺. Típico de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase é EC 1.2.1.12. Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase é codificada por *gapA* em *E. coli*.

[0086] As expressões “fosfoenolpiruvato carboxilase” e “Ppc” designam uma proteína que catalisa a conversão de fosfoenolpiruvato + H₂O + CO₂ em fosfato + ácido oxaloacético. É típico de fosfoenolpiruvato carboxilase EC 4.1.1.31. O fosfoenolpiruvato carboxilase é codificado por *ppc* em *E. coli*.

[0087] O termo “YciK” designa uma suposta enzima codificada por *yciK* que é acoplada por tradução a *btuR*, o gene que codifica Cob(I)alamina adenosiltransferase em *Escherichia coli*.

[0088] A expressão “cob(I)alamina adenosiltransferase” designa uma enzima responsável pela transferência de uma porção desoxiadenosila do ATP para o corrinóide reduzido. Típico de cob(I)alamina adenosiltransferase é EC 2.5.1.17. Cob(I)alamina adenosiltransferase é codificada pelo gene “*btuR*” (GenBank M21528) em *Escherichia coli*, “*cobA*” (GenBank L08890) em *Salmonella typhimurium* e “*cobO*” (GenBank M62866) em *Pseudomonas denitrificans*.

DEFINIÇÕES ADICIONAIS

[0089] A expressão “promotor 1.20 GI curto” refere-se a SEQ ID N° 31. A expressão “promotor 1.5 GI curto” indica SEQ ID N° 28. As expressões “promotor 1.6 GI curto” e “promotor do tipo selvagem curto” são utilizadas de forma intercambiável e indicam a SEQ ID N° 32.

[0090] As expressões “glicerol-3-fosfato desidrogenase” e “G3PDH” designam um polipeptídeo responsável pela atividade da enzima que catalisa a conversão de diidroxiacetona fosfato (DHAP) em glicerol-3-fosfato (G3P). G3PDH *in vivo* pode ser NADH; NADPH; ou dependente de FAD. Ao referir-se especificamente a um cofator específico glicerol-3-fosfato desidrogenase, serão utilizadas as expressões “glicerol-3-fosfato desidrogenase dependente de NADH”, “glicerol-3-fosfato desidrogenase dependente de NADPH” e “glicerol-3-fosfato desidrogenase dependente de FAD”. Como geralmente é o caso que glicerol-3-fosfato desidrogenases dependentes de NADH e dependentes de NADPH são capazes de utilizar NADH e NADPH de forma intercambiável (por exemplo, pelo gene codificado por *gpsA*), as expressões glicerol-3-fosfato desidrogenase dependente de NADH e dependente de NADPH serão utilizadas de forma intercambiável. A enzima dependente de NADH (EC 1.1.1.8) é codificada, por exemplo, por vários genes que incluem GPD1 (GenBank Z74071x2) ou GPD2 (GenBank Z35169x1) ou GPD3 (GenBank G984182) ou DAR1 (GenBank Z74071x2). A enzima dependente de NADPH (EC 1.1.1.94) é codificada por *gpsA* (GenBank U321643 (cds 197911-196892), G466746 e L45246). A enzima dependente de FAD (EC 1.1.99.5) é codificada por GUT2 (GenBank Z47047x23) ou *glpD* (GenBank G147838) ou *glpABC* (GenBank M20938) (vide o documento WO 9928480 e referências ali contidas, que são incorporadas ao presente como referência).

[0091] Os termos “glicerol-3-fosfatase”, “sn-glicerol-3-fosfatase” ou “d,l-glicerol fosfatase” e “G3P fosfatase” designam um polipeptídeo responsável por

uma atividade enzimática que catalisa a conversão de glicerol-3-fosfato e água em glicerol e fosfato inorgânico. G3P fosfatase é codificada, por exemplo, por GPP1 (GenBank Z47047x125) ou GPP2 (GenBank U18813x11) (vide o documento WO 9928480 e referências ali contidas, que são incorporadas ao presente como referência).

[0092] A expressão “glicerol quinase” designa um polipeptídeo responsável por atividade enzimática que catalisa a conversão de glicerol e ATP em glicerol-3-fosfato e ADP. O doador de fosfato de alta energia ATP pode ser substituído por substitutos fisiológicos (tais como fosfoenolpiruvato). Glicerol quinase é codificada, por exemplo, por GUT1 (GenBank U11583x19) e *g/pK* (GenBank L19201) (vide o documento WO 9928480 e referências ali contidas, que são incorporadas ao presente como referência).

[0093] A expressão “glicerol desidrogenase” indica um polipeptídeo responsável por uma atividade enzimática que catalisa a conversão de glicerol em diidroxiacetona (EC 1.1.1.6) ou glicerol em gliceraldeído (EC 1.1.1.72). Um polipeptídeo responsável por uma atividade enzimática que catalisa a conversão de glicerol em diidroxiacetona também é denominado “diidroxiacetona reductase”. A Glicerol desidrogenase pode ser dependente de NADH (EC 1.1.1.6), NADPH (EC 1.1.1.72) ou outros cofatores (tais como EC 1.1.99.22). Um glicerol desidrogenase dependente de NADH é codificado, por exemplo, por *g/dA* (GenBank U00006) (vide o documento WO 99/28480 e referências ali contidas, que são incorporadas ao presente como referência).

[0094] A expressão “enzima desidratase” ou “desidratase” designará qualquer atividade enzimática que catalise a conversão de uma molécula de glicerol no produto 3-hidroxi propionaldeído. Para os propósitos da presente invenção, as enzimas desidratases incluem um glicerol desidratase (EC 4.2.1.30) e um diol desidratase (EC 4.2.1.28) que contêm substratos preferidos de glicerol e 1,2-propanodiol, respectivamente. Genes para enzimas desidratase foram identificados

em *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium pasteurianum*, *Salmonella typhimurium* e *Klebsiella oxytoca*. Em cada caso, a desidratase é composta de três subunidades: a subunidade “ α ” ou grande, a subunidade “ β ” ou média e a subunidade “ γ ” ou pequena. Devido à uma ampla variação de nomenclatura gênica utilizada na literatura, é fornecido uma ilustração comparativa na Tabela 1 para facilitar a identificação. Os genes também são descritos, por exemplo, em Daniel et al., (*FEMS Microbiol. Rev.* 22, 553 (1999)) e Toraya e Mori (*J. Biol. Chem.* 274, 3372 (1999)). Em relação à Tabela 1, os genes que codificam a subunidade “ α ” ou grande de glicerol desidratase incluem *dhaB1*, *gldA* e *dhaB*; os genes que codificam a subunidade “ β ” ou média incluem *dhaB2*, *gldB* e *dhaC*; os genes que codificam a subunidade “ γ ” ou pequena incluem *dhaB3*, *gldC* e *dhaE*. Também em relação à Tabela 1, os genes que codificam a subunidade “ α ” ou grande de diol desidratase incluem *pduC* e *pddA*; os genes que codificam a subunidade “ β ” ou média incluem *pduD* e *pddB*; os genes que codificam a subunidade “ γ ” ou pequena incluem *pduE* e *pddC*.

TABELA 1

GRÁFICO COMPARATIVO DE NOMES GENÉTICOS E REFERÊNCIAS GENBANK PARA DESIDRATASE E FUNÇÕES LIGADAS A DESIDRATASE

FUNÇÃO GENÉTICA:

ORGANISMO (Referência GenBank)	Reguladora		Desconhecida		Reativação		1,3-PD desidrogenase		Desconhecida	
	gene	pares	gene	pares	gene	pares	gene	pares	gene	pares
		base		base		base		base		base
<i>K. pneumoniae</i> (SEQ ID N° 1)	<i>dhaR</i>	2209- 4134	<i>orfW</i>	4112- 4642	<i>orfX</i>	4643- 4996	<i>dhaT</i>	5017- 6108	<i>orfY</i>	6202- 6630
<i>K. pneumoniae</i> (U30903)			<i>orf2c</i>	7116- 7646	<i>orf2b</i>	6762- 7115	<i>dhaT</i>	5578- 6741	<i>orf2a</i>	5125- 5556

ORGANISMO (Referência GenBank)	Reguladora		Desconhecida		Reativação		1,3-PD desidrogenase		Desconhecida	
	gene	pares	gene	pares	gene	pares	gene	pares	gene	pares
		base		base		base		base		base
<i>K. pneumoniae</i> (U60992)					<i>Gdrb</i>					
<i>C. freundii</i> (U09771)	<i>dhaR</i>	3746- 5671	<i>orfW</i>	5649- 179	<i>orfX</i>	6180- 6533	<i>dhaT</i>	6550- 7713	<i>orfY</i>	7736- 8164
<i>C. pasteurianum</i> (AF051373)										
<i>C. pasteurianum</i> (AF006034)			<i>orfW</i>	210-731	<i>orfX</i>	1-196	<i>dhaT</i>	1232- 2389	<i>orfY</i>	746- 1177
<i>S. typhimurium</i> (AF026270)					<i>PduH</i>	8274- 8645				
<i>K. oxytoca</i> (AF017781)					<i>DdrB</i>	2063- 2240				
<i>K. oxytoca</i> (AF051373)										

FUNÇÃO GENÉTICA:

ORGANISMO (Referência GenBank)	desidratase, α		desidratase, β		desidratase, γ		reativação	
	gene	pares	gene	pares	gene	pares	gene	pares
		base		base		base		base
<i>K. pneumoniae</i> (SEQ ID N° 1)	<i>dhaB1</i>	7044- 8711	<i>dhaB2</i>	8724- 9308	<i>dhaB3</i>	9311- 9736	<i>orfZ</i>	9749- 11572
<i>K. pneumoniae</i> (U30903)	<i>dhaB1</i>	3047- 4714	<i>dhaB2</i>	2450- 2890	<i>dhaB3</i>	2022- 2447	<i>dhaB4</i>	186-2009

ORGANISMO (Referência GenBank)	desidratase, α		desidratase, β		desidratase, γ		reativação	
	gene	pares base	gene	pares base	gene	pares base	gene	pares base
<i>K. pneumoniae</i> (U60992)	<i>gldA</i>	121-1788	<i>gldB</i>	1801- 2385	<i>gldC</i>	2388- 2813	<i>gdrA</i>	
<i>C. freundii</i> (U09771)	<i>dhaB</i>	8556- 10223	<i>dhaC</i>	10235- 10819	<i>dhaE</i>	10822- 11250	<i>orfZ</i>	11261- 13072
<i>C. pasteurianum</i> (AF051373)	<i>dhaB</i>	84-1748	<i>dhaC</i>	1779- 2318	<i>dhaE</i>	2333- 2773	<i>orfZ</i>	2790- 4598
<i>C. pasteurianum</i> (AF006034)								
<i>S. typhimurium</i> (AF026270)	<i>pduC</i>	3557- 5221	<i>pduD</i>	5232- 5906	<i>pduE</i>	5921- 6442	<i>pduG</i>	6452- 8284
<i>K. oxytoca</i> (AF017781)							<i>ddrA</i>	241-2073
<i>K. oxytoca</i> (AF051373)	<i>pddA</i>	121-1785	<i>pddB</i>	1796- 2470	<i>pddC</i>	2485- 3006		

[0095] Glicerol e diol desidratases estão sujeitas a desativação por suicídio com base em mecanismos por glicerol e alguns outros substratos (Daniel et al., *FEMS Microbiol. Rev.* 22, 553 (1999)). A expressão “fator de reativação de desidratase” designa as proteínas responsáveis pela reativação da atividade de desidratase. As expressões “atividade de reativação de desidratase”, “reativação da atividade de desidratase” ou “regeneração da atividade de desidratase” designam o fenômeno de conversão de uma desidratase incapaz de catálise de um substrato em outro capaz de catálise de um substrato ou o fenômeno de inibição da desativação de uma desidratase, ou o fenômeno de extensão da meia-vida útil da enzima desidratase *in vivo*. Duas proteínas foram identificadas como estando envolvidas como o fator de

reativação de desidratase (vide o documento WO 98/21341 (US 6.013.494) e referências ali contidas, que são incorporadas ao presente como referência; Daniel et al., acima; Toraya e Mori, *J. Biol. Chem.* 274, 3372 (1999); e Tobimatsu et al., *J. Bacteriol.* 181, 4110 (1999)). Em relação à Tabela 1, os genes que codificam uma das proteínas incluem *orfZ*, *dhaB4*, *gdrA*, *pduG* e *ddrA*. Também em relação à Tabela 1, os genes que codificam a segunda das duas proteínas incluem *orfX*, *orf2b*, *gdrB*, *pduH* e *ddrB*.

[0096] As expressões “1,3-propanodiol oxidoreductase”, “1,3-propanodiol desidrogenase” ou “DhaT” designam o(s) polipeptídeo(s) responsável(is) por uma atividade enzimática que é capaz de catalisar a interconversão de 3-HPA e 1,3-propanodiol, desde que o(s) gene(s) que codifica(m) essa atividade seja(m) considerado(s) ligado(s) física ou transcricionalmente a uma enzima desidratase no seu ambiente natural (ou seja, tipo selvagem); o gene é encontrado, por exemplo, em um regulon *dha* como é o caso com *dhaT* de *Klebsiella pneumoniae*. Em relação à Tabela 1, os genes que codificam uma 1,3-propanodiol oxidoreductase incluem *dhaT* de *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii* e *Clostridium pasteurianum*. Cada um destes genes codifica um polipeptídeo pertencente à família de álcool desidrogenases do tipo III, exibe um motivo de ligação férrica conservado e possui preferência pela interconversão ligada a NAD⁺/NADH de 3-HPA e 1,3-propanodiol (Johnson e Lin, *J. Bacteriol.* 169, 2050 (1987); Daniel et al., *J. Bacteriol.* 177, 2151 (1995); e Leurs et al., *FEMS Microbiol. Lett.* 154, 337 (1997)). Enzimas com propriedades físicas similares foram isoladas a partir de *Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus buchneri* (Veiga da Cunha e Foster, *App. Environ. Microbiol.* 58, 2005 (1992)).

[0097] A expressão “regulon *dha*” designa um conjunto de genes associados ou matrizes de leitura aberta que codificam várias atividades biológicas, que incluem, mas sem limitar-se a atividade de desidratase,

atividade de reativação e 1,3-propanodiol oxidoreductase. Tipicamente, um regulon dha compreende as matrizes de leitura aberta *dhaR*, *orfY*, *dhaT*, *orfX*, *orfW*, *dhaB1*, *dhaB2*, *dhaB3* e *orfZ*, conforme descrito no presente.

[0098] A expressão “atividade catalítica não-específica” designa o(s) polipeptídeo(s) responsável(is) por uma atividade enzimática que é(são) suficiente(s) para catalisar a interconversão de 3-HPA e 1,3-propanodiol e exclui especificamente 1,3-propanodiol oxidoreductase(s). Tipicamente, estas enzimas são álcool desidrogenases. Estas enzimas podem utilizar cofatores diferentes de NAD⁺/NADH, incluindo, mas sem limitar-se a flavinas tais como FAD ou FMN. Um gene para um álcool desidrogenase não-específica (*yqhD*) é considerado, por exemplo, codificado endogenamente e expresso funcionalmente em linhagens K₁₂ de *E. coli*.

[0099] As expressões “função” ou “função enzimática” designam a atividade catalítica de uma enzima na alteração da energia necessária para realizar uma reação química específica. Compreende-se que esta atividade pode aplicar-se a uma reação em equilíbrio em que a produção de produto ou substrato pode ser obtida sob condições apropriadas.

[00100] Os termos “polipeptídeo” e “proteína” são utilizados de forma intercambiável.

[00101] As expressões “substrato de carbono” e “fonte de carbono” designam uma fonte de carbono capaz de ser metabolizada por microorganismos hospedeiros de acordo com a presente invenção e, particularmente, fontes de carbono selecionadas a partir do grupo que consiste em monossacarídeos, oligossacarídeos, polissacarídeos e substratos de um carbono ou suas misturas.

[00102] As expressões “célula hospedeira” ou “microorganismo hospedeiro” designam um microorganismo capaz de receber genes exógenos ou heterólogos e de expressar estes genes para gerar um produto gênico ativo.

[00103] As expressões “gene exógeno”, “DNA exógeno”, “gene heterólogo” e “DNA heterólogo” designam um material genético nativo de um organismo que tenha sido colocado em um microorganismo hospedeiro por vários meios. O gene de interesse pode ser um gene de ocorrência natural, gene que sofreu mutação ou gene sintético.

[00104] Os termos “transformação” e “transfecção” designam a obtenção de novos genes em uma célula após a incorporação de ácido nucléico. Os genes obtidos podem ser integrados a DNA cromossômico ou introduzidos na forma de seqüências replicáveis extracromossômicas. O termo “transformante” designa o produto de uma transformação.

[00105] A expressão “geneticamente alterado” indica o processo de mudança de material hereditário através de transformação ou mutação.

[00106] As expressões “microorganismo recombinante” e “hospedeiro transformado” designam qualquer microorganismo que tenha sido transformado com genes exógenos ou heterólogos ou cópias adicionais de genes homólogos. Os microorganismos recombinantes de acordo com a presente invenção expressam genes exógenos que codificam glicerol-3-fosfato desidrogenase (GPD1), glicerol-3-fosfatase (GPP2), glicerol desidratase (*dhaB1*, *dhaB2* e *dhaB3*), fator de reativação de desidratase (*orfZ* e *orfX*) e, opcionalmente, 1,3-propanodiol oxidoreductase (*dhaT*) para a produção de 1,3-propanodiol a partir de substratos de carbono apropriados. Uma realização preferida é uma *E. coli* transformada com estes genes mas que não contém *dhaT* funcional. Um microorganismo hospedeiro, diferente de *E. coli*, pode também ser transformado para conter os genes descritos e o gene para a atividade catalítica não-específica para a interconversão de 3-HPA e 1,3-propanodiol, excluindo especificamente 1,3-propanodiol oxidoreductase(s) (*dhaT*).

[00107] “Gene” indica um fragmento de ácido nucléico que

expressa uma proteína específica, incluindo seqüências reguladoras anteriores (5' não-codificadoras) e posteriores (3' não-codificadoras) à região de codificação. As expressões “nativo” e “tipo selvagem” designam um gene conforme encontrado na natureza com as suas próprias seqüências reguladoras.

[00108] O termo “codificação” indica o processo através do qual um gene, através dos mecanismos de transcrição e tradução, produz uma seqüência de aminoácidos. Compreende-se que o processo de codificação de uma seqüência de aminoácidos específica inclui seqüências de DNA que podem envolver mudanças de base que não causam mudança no aminoácido codificado ou que envolvem mudanças de base que podem alterar um ou mais aminoácidos, mas não afetam as propriedades funcionais da proteína codificada pela seqüência de DNA. Compreende-se, portanto, que a presente invenção engloba mais que as seqüências de exemplos específicas.

[00109] O termo “isolado” indica uma seqüência de DNA ou proteína que é removida de pelo menos um componente com o qual é associado naturalmente.

[00110] Uma “molécula de ácido nucléico isolada” é um polímero de RNA ou DNA que é de fita dupla ou simples, contendo opcionalmente bases de nucleotídeos sintéticas, não-naturais ou alteradas. Uma molécula de ácido nucléico isolada na forma de um polímero de DNA pode ser composta de um ou mais segmentos de cDNA, DNA genômico ou DNA sintético.

[00111] “Substancialmente similar” indica moléculas de ácido nucléico em que mudanças em uma ou mais bases de nucleotídeos resultam na substituição de um ou mais aminoácidos, mas não afetam as propriedades funcionais da proteína codificada pela seqüência de DNA. “Substancialmente similar” também se refere a moléculas de ácido nucléico em que mudanças em uma ou mais bases de nucleotídeos não afetam a capacidade da molécula de

ácido nucléico de mediar a alteração da expressão gênica através de tecnologia de co-supressão ou antisense. “Substancialmente similar” também designa modificações das moléculas de ácido nucléico de acordo com a presente invenção (tais como deleção ou inserção de uma ou mais bases de nucleotídeos) que não afetam substancialmente as propriedades funcionais do transcrito resultante em relação à capacidade de mediar a alteração da expressão gênica através de tecnologia antisense ou de co-supressão ou alteração das propriedades funcionais da molécula de proteína resultante. A presente invenção engloba mais que as seqüências de exemplos específicas.

[00112] É bem conhecido no estado da técnica, por exemplo, que alterações em um gene que resultam na produção de um aminoácido quimicamente equivalente em um dado sítio, mas não efetuam as propriedades funcionais da proteína codificada são comuns. Para os propósitos da presente invenção, as substituições são definidas como trocas dentro de um dos cinco grupos a seguir:

1. Resíduos pequenos alifáticos, não-polares ou levemente polares: Ala, Ser, Thr (Pro, Gly);
2. Resíduos polares carregados negativamente e suas amidas: Asp, Asn, Glu, Gln;
3. Resíduos polares carregados positivamente: His, Arg, Lys;
4. Resíduos não-polares alifáticos grandes: Met, Leu, Ile, Val (Cys); e
5. Resíduos aromáticos grandes: Phe, Tyr, Trp.

[00113] Desta forma, um códon para o aminoácido alanina, um aminoácido hidrofóbico, pode ser substituído por um códon que codifica outro resíduo menos hidrofóbico (tal como glicina) ou um resíduo mais hidrofóbico (tal como valina, leucina ou isoleucina). De forma similar, pode-se esperar que mudanças que resultam na substituição de um resíduo carregado

negativamente por outro (tal como ácido aspártico por ácido glutâmico) ou um resíduo carregado positivamente por outro (tal como lisina por arginina) gerem

[00114] produto funcionalmente equivalente.

[00115] Em muitos casos, também não se esperaria que mudanças de nucleotídeos que resultem na alteração das porções N-terminal e C-terminal da molécula de proteína alterem a atividade da proteína.

[00116] Cada uma das modificações propostas encontra-se dentro do conhecimento rotineiro do estado da técnica, bem como a determinação da retenção da atividade biológica dos produtos codificados. Além disso, os técnicos no assunto reconhecem que seqüências substancialmente similares englobadas pela presente invenção também são definidas pela sua capacidade de hibridização, sob condições estridentes (0,1X SSC, 0,1% SDS, 65°C e lavado com 2X SSC, 0,1% SDS seguido por 0,1X SSC, 0,1% SDS), com as seqüências exemplificadas no presente. Os fragmentos de ácido nucléico substancialmente similares preferidos de acordo com a presente invenção são os fragmentos de ácidos nucléicos cujas seqüências de DNA são pelo menos 80% idênticas à seqüência de DNA dos fragmentos de ácido nucléico relatados no presente. Fragmentos de ácidos nucléicos de maior preferência são pelo menos 90% idênticos à seqüência de DNA dos fragmentos de ácidos nucléicos relatados no presente. São de preferência superior os fragmentos de ácidos nucléicos pelo menos 95% idênticos à seqüência de DNA dos fragmentos de ácidos nucléicos relatados no presente.

[00117] Um fragmento de ácido nucléico é “hibridizável” com outro fragmento de ácido nucléico, tal como cDNA, DNA genômico ou RNA, quando uma forma de fita simples do fragmento de ácido nucléico puder hibridizar-se ao outro fragmento de ácido nucléico sob as condições apropriadas de temperatura e resistência iônica da solução. As condições de lavagem e

hibridização são bem conhecidas e exemplificadas em Sambrook, J., Fritsch, E. F. e Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edição, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (1989), particularmente Capítulo 11 e Tabela 11.1 (incorporados integralmente ao presente como referência). As condições de temperatura e resistência iônica determinam a “estringência” da hibridização. Para seleção preliminar de ácidos nucleicos homólogos, condições de hibridização sob baixa estringência, correspondentes a T_m de 55°C, podem ser utilizadas, tais como 5X SSC, 0,1% SDS, 0,25% leite e nenhuma formamida; ou 30% formamida, 5X SSC, 0,5% SDS. Condições de hibridização sob estringência moderada correspondem a T_m mais alta, tal como 40% formamida, com 5X ou 6X SSC. A hibridização requer que os dois ácidos nucleicos contenham seqüências complementares, embora dependendo da estringência da hibridização, incongruências entre as bases são possíveis. A estringência apropriada para hibridização de ácidos nucleicos depende do comprimento dos ácidos nucleicos e do grau de complementação, variáveis bem conhecidas do estado da técnica. Quanto maior o grau de similaridade ou homologia entre duas seqüências de nucleotídeos, maior o valor de T_m para híbridos de ácidos nucleicos que contêm essas seqüências. A estabilidade relativa (correspondente a T_m mais alta) de hibridização de ácido nucleico é reduzida na seguinte ordem: RNA:RNA, DNA:RNA, DNA:DNA. Para híbridos de mais de 100 nucleotídeos de comprimento, foram derivadas equações para o cálculo de T_m (vide Sambrook et al., acima, 9.50-9.51). Para hibridização com ácidos nucleicos mais curtos, ou seja, oligonucleotídeos, a posição de incongruências torna-se mais importante e o comprimento do oligonucleotídeo determina a sua especificidade (vide Sambrook et al., acima, 11.7-11.8). Em uma realização, o comprimento para um ácido nucleico hibridizável é de pelo menos cerca de 10 nucleotídeos. O comprimento mínimo preferido para um ácido nucleico hibridizável é de pelo menos cerca de 15 nucleotídeos; de maior

preferência, pelo menos cerca de 20 nucleotídeos; e, de maior preferência ainda, o comprimento é de pelo menos 30 nucleotídeos. Além disso, os técnicos no assunto reconhecerão que a concentração de sais na solução de lavagem e a temperatura podem ser ajustadas conforme o necessário, de acordo com fatores tais como o comprimento da sonda.

[00118] Uma “porção substancial” designa uma seqüência de aminoácidos ou de nucleotídeos que compreende seqüência de aminoácidos suficiente de um polipeptídeo ou seqüência de nucleotídeos de um gene para permitir a suposta identificação daquele polipeptídeo ou gene, seja através de avaliação manual da seqüência pelos técnicos no assunto, ou através de comparação de seqüências automatizada por computador e identificação utilizando algoritmos tais como BLAST (Ferramenta de Busca de Alinhamento Local Básico; Altschul et al., (1993), *J. Mol. Biol.* 215: 403-410; vide também www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). De forma geral, uma seqüência de 10 ou mais aminoácidos contíguos ou 30 ou mais nucleotídeos é necessária para identificar supostamente uma seqüência de ácidos nucléicos ou polipeptídeo como homóloga a uma proteína ou gene conhecido. Além disso, em relação às seqüências de nucleotídeos, sondas de oligonucleotídeos específicas de genes que compreendem de 20 a 30 nucleotídeos contíguos podem ser utilizadas em métodos dependentes de seqüências de identificação gênica (por exemplo, hibridização Southern) e isolamento (por exemplo, hibridização *in situ* de colônias bacterianas ou placas bacteriófagas). Além disso, oligonucleotídeos curtos de 12 a 15 bases podem ser utilizados como primers de amplificação em PCR, a fim de obter uma molécula de ácido nucléico específica que compreende os primers. Conseqüentemente, uma “porção substancial” de uma seqüência de nucleotídeos compreende seqüência suficiente para permitir a identificação específica e/ou isolamento de uma molécula de ácido nucléico que compreende a seqüência. O presente relatório descritivo ensina

seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos completas ou parciais que codificam polipeptídeos que compreendem uma ou mais proteínas específicas. Os técnicos no assunto, detendo o benefício das seqüências relatadas no presente, podem agora utilizar as seqüências descritas, no todo ou em porção substancial, para o propósito conhecido dos técnicos no assunto. Conseqüentemente, a presente invenção compreende as seqüências completas relatadas na Listagem de Seqüências anexa, bem como porções substanciais dessas seqüências, conforme definido acima.

[00119] O termo “complementar” descreve a relação entre bases de nucleotídeos que são capazes de hibridização entre si. Em relação ao DNA, por exemplo, adenosina é complementar a timina e citosina é complementar a guanina. Conseqüentemente, a presente invenção também inclui moléculas de ácidos nucléicos isolados que são complementares às seqüências completas, conforme relatado na Listagem de Seqüências anexa, bem como as seqüências de ácidos nucléicos substancialmente similares.

[00120] A expressão “identidade percentual”, da forma conhecida na técnica, é a relação entre duas ou mais seqüências de polipeptídeos ou duas ou mais seqüências de polinucleotídeos, conforme determinado através de comparação das seqüências. No estado da técnica, “identidade” também indica o grau de relação de seqüências entre seqüências de polipeptídeos ou polinucleotídeos, conforme venha a ser o caso, conforme determinado pela coincidência entre conjuntos dessas seqüências. “Identidade” e “similaridade” podem ser facilmente calculadas através de métodos conhecidos, que incluem, mas sem limitar-se a, os descritos em: *Computational Molecular Biology*; Lesk, A.M., Ed.; *Oxford University Press*, Nova Iorque, Estados Unidos, 1988; *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*; Smith, D. W., Ed.; *Academic Press*, Nova Iorque, Estados Unidos, 1993; *Computer Analysis of Sequence Data, Part I*; Griffin, A. M. e Griffin, H. G., Eds.; *Humana Press*, Nova Jérsei,

Estados Unidos, 1994; *Sequence Analysis in Molecular Biology*; von Heinje, G., Ed.; *Academic Press*: Nova Iorque, 1987; e *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. e Devereux, J., Eds.; *Stockton Press*, Nova Iorque, Estados Unidos, 1991. Os métodos preferidos de determinação de identidade são projetados para gerar a melhor coincidência entre as seqüências testadas.

[00121] Os métodos de determinação de identidade e similaridade são codificados em programas de computador disponíveis ao público. Métodos de programas de computador preferidos para determinar a identidade e a similaridade entre duas seqüências incluem, mas sem limitar-se a, o programa GCG Pileup encontrado no pacote de programas GCG, utilizando o algoritmo de Needleman e Wunsch com seus valores padrão implícitos de penalidade de criação do intervalo = 12 e penalidade do comprimento do intervalo = 4 (Devereux et al., *Nucleic Acids Res.* 12: 387-395 (1984)), BLASTP, BLASTN e FASTA (Pearson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85: 2444-2448 (1988)). O programa BLASTX é disponível ao público através do NCBI e outras fontes (*BLAST Manual*, Altschul et al., *Natl. Cent. Biotechnol. Inf., Natl. Library Med.* (NCBI NLM) NIH, Bethesda MD 20894, Estados Unidos; Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 (1990); Altschul et al., *Gapped BLAST and PSI-BLAST: A New Generation of Protein Database Search Programs*, *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402 (1997)). Outro método preferido de determinação da identidade percentual é através do método de protocolo de alinhamento de proteínas DNASTAR utilizando o algoritmo Jotun-Hein (Hein et al., *Methods Enzymol.* 183: 626-645 (1990)). Os parâmetros implícitos para o método de Jotun-Hein de alinhamentos são: para alinhamentos múltiplos, penalidade do intervalo = 11, penalidade do comprimento do intervalo = 3; para alinhamentos em pares, espaçamento em diagonais = 6. Como ilustração, por polinucleotídeo que contém uma seqüência de nucleotídeos que contém pelo menos, por exemplo, 95% de "identidade" com uma seqüência de nucleotídeos de referência,

entendem-se que a seqüência de nucleotídeos do polinucleotídeo seja idêntica à seqüência de referência, exceto pelo fato de que a seqüência de polinucleotídeos pode incluir até cinco mutações pontuais para cada cem nucleotídeos da seqüência de nucleotídeos de referência. Em outras palavras, para se obter um polinucleotídeo que contém uma seqüência de nucleotídeos pelo menos 95% idêntica a uma seqüência de nucleotídeos de referência, até 5% dos nucleotídeos na seqüência de referência podem ser deletados ou substituídos por outro nucleotídeo, ou quantidade de nucleotídeos de até 5% do total de nucleotídeos na seqüência de referência pode ser inserida na seqüência de referência. Estas mutações da seqüência de referência podem ocorrer nas posições 5' ou 3' terminais da seqüência de nucleotídeos de referência ou em qualquer ponto entre essas posições terminais, dispersas individualmente entre os nucleotídeos na seqüência de referência ou em um ou mais grupos contíguos na seqüência de referência. De forma análoga, por polipeptídeo que contém uma seqüência de aminoácidos que possui, por exemplo, pelo menos 95% de identidade com uma seqüência de aminoácidos de referência, entende-se que a seqüência de aminoácidos do polipeptídeo seja idêntica à seqüência de referência, exceto pelo fato de que a seqüência de polipeptídeos pode incluir até cinco alterações de aminoácidos para cada cem aminoácidos do aminoácido de referência. Em outras palavras, para se obter um polipeptídeo que possui uma seqüência de aminoácidos pelo menos 95% idêntica a uma seqüência de aminoácidos de referência, até 5% dos resíduos de aminoácidos na seqüência de referência podem ser deletados ou substituídos por outro aminoácido, ou um número de aminoácidos de até 5% do total de resíduos de aminoácidos na seqüência de referência pode ser inserido na seqüência de referência. Estas alterações da seqüência de referência podem ocorrer nas posições amino ou carbóxi terminais da seqüência de aminoácidos de referência ou em qualquer ponto entre essas

posições terminais, dispersas individualmente entre resíduos na seqüência de referência ou em um ou mais grupos contíguos dentro da seqüência de referência.

[00122] O termo “homólogo” designa uma proteína ou polipeptídeo nativo ou de ocorrência natural em uma dada célula hospedeira. A presente invenção inclui microorganismos que produzem proteínas homólogas através de tecnologia de DNA recombinante.

[00123] A expressão “homologia percentual” designa a extensão da identidade de seqüências de aminoácidos entre polipeptídeos. Quando uma primeira seqüência de aminoácidos for idêntica a uma segunda seqüência de aminoácidos, a primeira e a segunda seqüência de aminoácidos exibem 100% de homologia. A homologia entre quaisquer dois polipeptídeos é função direta da quantidade total de aminoácidos coincidentes em uma dada posição em qualquer seqüência, por exemplo, se metade da quantidade total de aminoácidos em qualquer das duas seqüências for a mesma, afirma-se que as duas seqüências exibem 50% de homologia.

[00124] “Degeneração do códon” indica a divergência no código genético que permite variação da seqüência de nucleotídeos sem afetar a seqüência de aminoácidos de um polipeptídeo codificado. O técnico no assunto conhece bem a “influência do códon” (*codon-bias*) exibida por uma célula hospedeira específica na utilização de códons de nucleotídeos para especificar um dado aminoácido. Portanto, ao sintetizar um gene para aumento da expressão em uma célula hospedeira, é desejável projetar o gene de tal forma que a sua freqüência de uso do códon aproxime-se da freqüência de uso do códon preferida da célula hospedeira.

[00125] Modificações da seqüência, tais como deleções, inserções ou substituições na seqüência que produzem mudanças silenciosas que não afetam substancialmente as propriedades funcionais da molécula de

proteína resultante também são contempladas. Alterações na seqüência gênica que refletem a degeneração do código genético, ou que resultam na produção de um aminoácido quimicamente equivalente em dado sítio, por exemplo, são contempladas. Desta forma, um códon para o aminoácido alanina, aminoácido hidrofóbico, pode ser substituído por um códon que codifica outro resíduo menos hidrofóbico, tal como glicina, ou um resíduo mais hidrofóbico, tal como valina, leucina ou isoleucina. De forma similar, pode-se também esperar que mudanças que resultem na substituição de um resíduo carregado negativamente por outro, tal como ácido aspártico por ácido glutâmico, ou um resíduo carregado positivamente por outro, tal como lisina por arginina, gerem um produto biologicamente equivalente. Também não se esperaria que mudanças de nucleotídeos que resultem na alteração das porções N-terminal e C-terminal da molécula de proteína alterem a atividade da proteína. Em alguns casos, pode de fato ser desejável fazer mutantes da seqüência, a fim de estudar o efeito da alteração sobre a atividade biológica da proteína. Cada uma das modificações propostas encontra-se bem dentro do conhecimento rotineiro do estado da técnica, bem como a determinação da retenção da atividade biológica nos produtos codificados. Além disso, os técnicos no assunto reconhecem que as seqüências englobadas pela presente invenção também são definidas pela sua capacidade de hibridização, sob condições estridentes (0,1X SSC, 0,1% SDS, 65°C), com as seqüências exemplificadas no presente.

[00126] O termo “expressão” designa a transcrição e tradução em produto gênico de um gene que codifica a seqüência do produto gênico.

[00127] Os termos “plasmídeo”, “vetor” e “cassete” designam um elemento cromossômico adicional que freqüentemente conduz genes que não são parte do metabolismo central da célula, normalmente na forma de moléculas de DNA de dupla fita circulares. Estes elementos podem ser seqüências de replicação autônoma, seqüências que integram genoma,

seqüências de nucleotídeos ou fagos, lineares ou circulares, de um RNA ou DNA simples ou dupla fita, derivado de qualquer fonte, em que uma série de seqüências de nucleotídeos ligou-se ou recombinau-se em uma única construção que é capaz de introduzir um fragmento promotor e seqüência de DNA para um produto gênico selecionado, juntamente com a seqüência 3' não-traduzida apropriada em uma célula. "Cassete de transformação" designa um vetor específico que contém um gene exógeno e que contém elementos além do gene exógeno que facilitam a transformação de uma célula hospedeira específica. "Cassete de expressão" indica um vetor específico que contém um gene exógeno e que contém elementos além do gene exógeno que permitem o aumento da expressão daquele gene em um hospedeiro exógeno.

CONSTRUÇÃO DE ORGANISMOS RECOMBINANTES

[00128] Organismos recombinantes que contêm os genes necessários que codificarão as vias enzimáticas para conversão de um substrato de carbono em 1,3-propanodiol podem ser construídos utilizando-se métodos bem conhecidos na técnica. Genes que codificam glicerol-3-fosfato desidrogenase (GPD1), glicerol-3-fosfatase (GPP2), glicerol desidratase (*dhaB1*, *dhaB2* e *dhaB3*), fator de reativação de desidratase (*orfZ* e *orfX*) e 1,3-propanodiol oxidoreductase (*dhaT*) foram isolados a partir de um hospedeiro nativo, tal como *Klebsiella* ou *Saccharomyces* e utilizados para transformar linhagens hospedeiras, tais como *E. coli* DH5 α , ECL707, AA200 ou KLP23.

ISOLAMENTO DE GENES

[00129] Os métodos de obtenção de genes desejados a partir de um genoma bacteriano são comuns e bem conhecidos na técnica de biologia molecular. Caso a seqüência do gene seja conhecida, por exemplo, bibliotecas genômicas apropriadas podem ser criadas através de digestão por endonuclease de restrição e podem ser selecionadas com sondas complementares à seqüência gênica desejada. Após o isolamento da

seqüência, o DNA pode ser amplificado utilizando-se métodos padrão de amplificação dirigida por primers tais como reação em cadeia de polimerase (PCR) (Patente US 4.683.202) para se obter quantidades de DNA apropriadas para transformação utilizando vetores adequados.

[00130] Alternativamente, podem ser criadas bibliotecas de cosmídeos nas quais grandes segmentos de DNA genômico (35 a 45 kb) podem ser embalados em vetores e utilizados para transformar hospedeiros apropriados. Os vetores de cosmídeos são exclusivos ao serem capazes de acomodar grandes quantidades de DNA. Geralmente, os vetores de cosmídeos contêm pelo menos uma cópia da seqüência de DNA *cos* que é necessária para embalagem e subsequente circularização do DNA exógeno. Além da seqüência de *cos*, estes vetores também conterão uma origem de replicação tal como ColE1 e marcadores de resistência a drogas tais como um gene resistente a ampicilina ou neomicina. Métodos de uso de vetores de cosmídeos para a transformação de hospedeiros bacterianos apropriados são bem descritos em Sambrook, J. et al., acima.

[00131] Tipicamente para clonar cosmídeos, DNA exógeno é isolado utilizando-se as endonucleases de restrição apropriadas e ligado adjacente à região *cos* do vetor de cosmídeo, utilizando as ligases apropriadas. Os vetores de cosmídeos que contêm o DNA exógeno linearizado são reagidos em seguida com um veículo de embalagem de DNA, tal como bacteriófago. Durante o processo de embalagem, os sítios *cos* são clivados e o DNA exógeno é embalado na porção anterior da partícula viral bacteriana. Estas partículas são utilizadas em seguida para transfectar células hospedeiras apropriadas, tais como *E. coli*. Uma vez injetado na célula, o DNA exógeno circulariza sob a influência das extremidades ligantes de *cos*. Desta maneira, segmentos grandes de DNA exógeno podem ser introduzidos e expressos em células hospedeiras recombinantes.

**ISOLAMENTO E CLONAGEM DE GENES QUE CODIFICAM GLICEROL DESIDRATASE
(DHAB1, DHAB2 E DHAB3), FATORES DE REATIVAÇÃO DE DESIDRATASE (ORFZ E
ORFX) E 1,3-PROPANODIOL DESIDROGENASE (DHAT)**

[00132] Os vetores de cosmídeos e métodos de transformação de cosmídeos foram utilizados dentro do contexto da presente invenção para clonar segmentos grandes de DNA genômico a partir de gêneros bacterianos conhecidos por possuírem genes capazes de processar glicerol em 1,3-propanodiol. Especificamente, DNA genômico de *K. pneumoniae* foi isolado através de métodos bem conhecidos na técnica e digerido com a enzima de restrição Sau3A para inserção em um vetor de cosmídeo Supercos 1 e embalado utilizando extratos de envoltório GigapackII. Após a construção do vetor XL1-Blue MR de *E. coli*, células foram transformadas com o DNA do cosmídeo. Transformadores foram selecionados pela capacidade de conversão de glicerol em 1,3-propanodiol através da cultura das células na presença de glicerol e análise dos meios para determinar a formação de 1,3-propanodiol.

[00133] Dois dos transformadores positivos para 1,3-propanodiol foram analisados e os cosmídeos foram denominados pKP1 e pKP2. O seqüenciamento de DNA revelou extensa homologia para o gene glicerol desidratase de *C. freundii*, o que demonstra que estes transformadores continham DNA codificador do gene glicerol desidratase. Outros transformadores positivos para 1,3-propanodiol foram analisados e os cosmídeos foram denominados pKP4 e pKP5. O seqüenciamento de DNA revelou que estes cosmídeos conduziram DNA codificador de um gene diol desidratase.

[00134] Embora a presente invenção utilize os genes isolados a partir do interior de um cosmídeo de *Klebsiella*, fontes alternativas de genes desidratase e genes de fator de reativação de desidratase incluem, mas sem limitar-se a *Citrobacter*, *Clostridia* e *Salmonella* (vide Tabela 1).

GENES QUE CODIFICAM G3PDH E G3P FOSFATASE

[00135] A presente invenção fornece genes apropriados para a expressão de atividades de G3PDH e G3P fosfatase em uma célula hospedeira.

[00136] Genes que codificam G3PDH são conhecidos. O GPD1, por exemplo, foi isolado a partir de *Saccharomyces* (Wang et al., acima). De forma similar, a atividade de G3PDH também foi isolada a partir de *Saccharomyces* codificado por GPD2 (Eriksson et al., *Mol. Microbiol.* 17, 95 (1995)).

[00137] Para os propósitos da presente invenção, contempla-se que qualquer gene que codifique um polipeptídeo responsável pela atividade de G3PDH dependente de NADH é apropriado, em que a atividade é capaz de catalisar a conversão de diidroxiacetona fosfato (DHAP) em glicerol-3-fosfato (G3P). Além disso, contempla-se que qualquer gene que codifique a sequência de aminoácidos de G3PDHs dependentes de NADH correspondentes aos genes DAR1, GPD1, GPD2, GPD3 e *gpsA* será funcional na presente invenção, em que aquela sequência de aminoácidos pode englobar substituições, deleções ou adições de aminoácidos que não alteram o funcionamento da enzima. Os técnicos no assunto apreciarão que genes que codificam G3PDH isolado de outras fontes também serão apropriados para uso na presente invenção. Genes que codificam G3P fosfatase são conhecidos. O GPP2, por exemplo, foi isolado a partir de *Saccharomyces cerevisiae* (Norbeck et al., *J. Biol. Chem.* 271, 13875 (1996)).

[00138] Para os propósitos da presente invenção, qualquer gene que codifique uma atividade de G3P fosfatase é apropriado para uso no método em que aquela atividade é capaz de catalisar a conversão de glicerol-3-fosfato mais H₂O em glicerol mais fosfato inorgânico. Além disso, qualquer gene que codifique a sequência de aminoácidos de G3P fosfatase

correspondente aos genes GPP2 e GPP1 será funcional na presente invenção, incluindo qualquer seqüência de aminoácidos que englobe substituições, deleções ou adições de aminoácidos que não alterem a função da enzima G3P fosfatase. Os técnicos no assunto apreciarão que genes que codificam G3P fosfatase isolados de outras fontes também serão apropriados para uso na presente invenção.

CÉLULAS HOSPEDEIRAS

[00139] As células hospedeiras apropriadas para a produção recombinante de 1,3-propanodiol podem ser procariontes ou eucariontes e somente serão limitadas pela capacidade da célula hospedeira de expressar as enzimas ativas para o processo de 1,3-propanodiol. As células hospedeiras apropriadas podem ser microorganismos tais como *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Aerobacter*, *Lactobacillus*, *Aspergillus*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Candida*, *Hansenula*, *Debaryomyces*, *Mucor*, *Torulopsis*, *Methylobacter*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Bacillus*, *Streptomyces* e *Pseudomonas*. São preferidos na presente invenção *Escherichia coli*, *Escherichia blattae*, *Klebsiella*, *Citrobacter* e *Aerobacter*. De maior preferência é *E. coli* (KLP23 (o documento WO 2001012833 A2)), RJ8.n (ATCC PTA-4216), *E. coli*: FMP'::Km (ATCC PTA4732), MG 1655 (ATCC 700926)).

VETORES E CASSETES DE EXPRESSÃO

[00140] A presente invenção fornece uma série de vetores e cassetes de transformação e expressão apropriados para a clonagem, transformação e expressão de G3PDH, G3P fosfatase, desidratase e fator de reativação de desidratase em uma célula hospedeira apropriada. Os vetores apropriados serão aqueles compatíveis com o microorganismo empregado. Os vetores apropriados podem ser derivados, por exemplo, de uma bactéria, vírus (tal como bacteriófago T7 ou fago derivado de M-13), cosmídeo, levedura ou

planta. Os protocolos de obtenção e uso desses vetores são conhecidos dos técnicos no assunto (Sambrook et al., acima).

[00141] Regiões de controle de início, ou promotores, que são úteis para dirigir a expressão dos genes G3PDH e G3P fosfatase (DAR1 e GPP2, respectivamente) na célula hospedeira desejada são numerosos e familiares aos técnicos no assunto. Virtualmente qualquer promotor capaz de dirigir esses genes é apropriado para a presente invenção, incluindo, mas sem limitar-se a, CYC1, HIS3, GAL1, GAL10, ADH1, PGK, PHO5, GAPDH, ADC1, TRP1, URA3, LEU2, ENO e TPI (úteis para expressão em *Saccharomyces*); AOX1 (útil para expressão em *Pichia*); e lac, trp, λ P_L, λ P_R, T7, tac e trc (úteis para expressão em *E. coli*).

[00142] As regiões de controle de término podem também derivar de vários genes nativos para os hospedeiros preferidos. Opcionalmente, um sítio de término pode ser desnecessário; entretanto, prefer-se que ele esteja incluído.

[00143] Para expressão efetiva das enzimas da presente invenção, o DNA que codifica as enzimas é operacionalmente ligado através de códons de início a regiões de controle de expressão selecionadas, de tal forma que a expressão resulte na formação do RNA mensageiro apropriado.

[00144] Particularmente úteis na presente invenção são os vetores pSYCO101, pSYCO103, pSYCO106 e pSYCO109. Os elementos essenciais são derivados do regulon *dha* isolado de *Klebsiella pneumoniae* e de *Saccharomyces cerevisiae*. Cada um deles contém as matrizes de leitura aberta *dhaB1*, *dhaB2*, *dhaB3*, *dhaX*, *orfX*, DAR1 e GPP2 dispostas em três operons separados, cujas seqüências de nucleotídeos são fornecidas em SEQ ID N° 65, SEQ ID N° 66, SEQ ID N° 67 e SEQ ID N° 68, respectivamente. As diferenças entre os vetores são ilustradas no gráfico abaixo (o prefixo “p-” indica um promotor; as matrizes de leitura aberta contidas entre cada “()”

representam a composição de um operon):

pSYCO101 (SEQ ID Nº 65):

p-trc (Dar1_GPP2) em orientação oposta em comparação com os outros dois operons dos processos;

p-1.6 GI longo (dhaB1_dhaB2_dhaB3_dhaX); e

p-1.6 GI longo (orfY_orfX_orfW).

pSYCO103 (SEQ ID Nº 66):

p-trc (Dar1_GPP2) mesma orientação em comparação com os outros dois operons dos processos;

p-1.5 GI longo (dhaB1_dhaB2_dhaB3_dhaX); e

p-1.5 GI longo (orfY_orfX_orfW).

pSYCO106 (SEQ ID Nº 67):

p-trc (Dar1_GPP2) mesma orientação em comparação com os outros dois operons dos processos;

p-1.6 GI longo (dhaB1_dhaB2_dhaB3_dhaX); e

p-1.6 GI longo (orfY_orfX_orfW).

pSYCO109 (SEQ ID Nº 68):

p-trc (Dar1_GPP2) mesma orientação em comparação com os outros dois operons dos processos;

p-1.6 GI longo (dhaB1_dhaB2_dhaB3_dhaX); e

p-1.6 GI longo (orfY_orfW).

TRANSFORMAÇÃO DE HOSPEDEIROS APROPRIADOS E EXPRESSÃO DE GENES PARA A

PRODUÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL

[00145] Uma vez que os cassetes apropriados sejam construídos, eles são utilizados para transformar células hospedeiras apropriadas. A introdução do cassete que contém os genes que codificam G3PDH, G3P fosfatase, desidratase e fator de reativação de desidratase na célula hospedeira pode ser realizada através de procedimentos conhecidos, tais como

através de transformação (utilizando, por exemplo, células permeabilizadas por cálcio, eletroporação) ou por transfecção utilizando um vírus de fago recombinante (Sambrook et al., acima).

[00146] Na presente invenção, foram utilizados cassetes para transformar *E. coli*, conforme descrito por completo em MÉTODOS GERAIS e EXEMPLOS.

MUTANTES

[00147] Além das células exemplificadas, contempla-se que o presente método será capaz de fazer uso de células que possuem mutações isoladas ou múltiplas projetadas especificamente para aumentar a produção de 1,3-propanodiol. As células que normalmente desviam um estoque de alimentação de carbono para processos não-produtivos, ou que exibem repressão de catabólitos significativa, poderão sofrer mutação para evitar estas deficiências fenotípicas. Muitas células do tipo selvagem, por exemplo, são submetidas a repressão catabólica a partir de glicose e subprodutos nos meios e contempla-se que linhagens mutantes destes organismos do tipo selvagem, capazes de produção de 1,3-propanodiol que são resistentes à repressão de glicose, seriam particularmente úteis na presente invenção.

[00148] Métodos de criação de mutantes são comuns e bem conhecidos na técnica. Células do tipo selvagem, por exemplo, podem ser expostas a uma série de agentes, tais como radiação ou mutagenes químicas, e são selecionadas em seguida pelo fenótipo desejado. Ao se criar mutações através de radiação, pode-se utilizar radiação ultravioleta (UV) ou ionizante. Comprimentos de onda UV de curtos apropriados para mutações gênicas encontraram-se dentro da faixa de 200 nm a 300 nm, em que 254 nm é preferido. A radiação UV neste comprimento de onda causa principalmente mudanças na sequência de ácido nucléico de guanidina e citosina para adenina e timidina. Como todas as células possuem mecanismos de reparo de

DNA que reparariam a maior parte das mutações induzidas por UV, agentes tais como cafeína e outros inibidores podem ser adicionados para interromper o processo de reparo e maximizar a quantidade de mutações efetivas. Mutações de UV de ondas compridas utilizando luz na faixa de 300 nm a 400 nm também são possíveis, mas, geralmente, não são tão eficazes quanto a luz UV de ondas curtas, a menos que utilizadas em conjunto com vários ativadores tais como colorante de psoralen que interagem com o DNA.

[00149] A mutagênese com agentes químicos também é eficaz para gerar mutantes e substâncias comumente utilizadas incluem substâncias químicas que afetam DNA não replicante, tal como HNO_2 e NH_2OH , bem como agentes que afetam DNA replicador, tal como colorante de acridina, notáveis por causarem mutações no quadro de leitura. Métodos específicos de criação de mutantes utilizando radiação ou agentes químicos são bem documentados na técnica. Vide, por exemplo, Thomas D. Brock em *Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology*, 2ª edição (1989), Sinauer Associates, Inc., Sunderland MA, Estados Unidos, ou Deshpande, Mukund V., *Appl. Biochem. Biotechnol.* 36, 227 (1992), incorporados ao presente como referência.

[00150] Após a ocorrência de mutagênese, mutantes que possuem o fenótipo desejado podem ser selecionados através de uma série de métodos. A seleção aleatória é a mais comum, em que as células mutagenizadas são selecionadas pela capacidade de geração do produto ou intermediário desejado. Alternativamente, o isolamento seletivo de mutantes pode ser realizado através da cultura de população mutagenizada sobre meios seletivos, em que somente colônias resistentes podem desenvolver-se. Métodos de seleção de mutantes são altamente desenvolvidos e bem conhecidos na técnica de microbiologia industrial. Vide, por exemplo, Brock, acima; DeMancilha et al., *Food Chem.*, 14, 313 (1984).

[00151] Além dos métodos de criação de mutantes descritos

acima, os genes selecionados envolvidos na conversão de substrato de carbono em 1,3-propanodiol podem ser suprarregulados ou infrarregulados através de uma série de métodos que são conhecidos dos técnicos no assunto. Compreende-se bem que a indução ou repressão de um gene designa uma alteração da atividade da proteína codificada por aquele gene em relação a um nível de atividade controle, tal como pela atividade da proteína codificada pelo gene de tipo selvagem correspondente (ou inalterado).

INDUÇÃO

[00152] Genes específicos envolvidos em um processo enzimático podem ser suprarregulados para aumentar a atividade da(s) sua(s) função(ões) codificada(s). Cópias adicionais de genes selecionados, por exemplo, podem ser introduzidas na célula hospedeira em plasmídeos de múltiplas cópias, tais como pBR322. Esses genes podem também ser integrados ao cromossomo com seqüências reguladoras apropriadas que resultam no aumento da atividade das suas funções codificadas. Os genes alvo podem ser modificados de forma a estarem sob o controle de promotores não-nativos ou promotores nativos alterados. Promotores endógenos podem ser alterados *in vivo* através de mutação, deleção e/ou substituição.

REPRESSÃO

[00153] Alternativamente, pode ser útil reduzir ou eliminar a expressão de certos genes em relação a um dado nível de atividade. Para os propósitos da presente invenção, é útil distinguir entre redução e eliminação. As expressões “repressão” e “infrarregulados” de um gene designam a redução, mas não a eliminação total, da atividade da proteína codificada. Métodos de repressão e interrupção de genes são conhecidos dos técnicos no assunto.

[00154] A repressão pode ocorrer através de deleção, inserção ou alteração de regiões de codificação e/ou regiões reguladoras (promotoras). Repressões específicas podem ser obtidas através de mutação aleatória, seguida

por seleção ou escolha ou, quando a sequência gênica for conhecida, por intervenção direta através de métodos de biologia molecular conhecidos dos técnicos no assunto. Um método particularmente útil, mas não exclusivo, de efetuar repressão é a alteração da resistência do promotor.

INTERRUPÇÃO

[00155] Interrupções de genes podem ocorrer, por exemplo, através de 1) deleção de regiões de codificação e/ou regiões reguladoras (promotoras); 2) inserção de sequências de ácidos nucleicos exógenos em regiões de codificação e/ou regiões reguladoras (promotoras); e 3) alteração de regiões de codificação e/ou regiões reguladoras (promotoras) (efetuando, por exemplo, mudanças de pares base de DNA). Essas mudanças evitam a expressão da proteína de interesse ou resultam na expressão de uma proteína que não é funcional. Interrupções específicas podem ser obtidos através de mutação aleatória seguida por seleção ou escolha ou, em casos em que a sequência gênica é conhecida, interrupções específicas podem ser obtidas através de intervenção direta utilizando métodos de biologia molecular conhecidos dos técnicos no assunto. Um método particularmente útil é a deleção de quantidades significativas de regiões de codificação e/ou regiões reguladoras (promotoras).

[00156] Métodos de alteração da expressão de proteínas recombinantes são conhecidos dos técnicos no assunto e são discutidos, em parte, em Baneyx, *Curr. Opinion Biotech.* (1999) 10: 411; Ross et al., *J. Bacteriol.* (1998) 180: 5375; deHaseth et al., *J. Bacteriol.* (1998) 180: 3019; Smolke e Keasling, *Biotech. and Bioengineering* (2002) 80: 762; Swartz, *Curr. Opinions Biotech.* (2001) 12: 195 e Ma et al., *J. Bacteriol.* (2002) 184: 5733.

ALTERAÇÕES NO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL

PROCESSO ENZIMÁTICO REPRESENTATIVO

[00157] A produção de 1,3-propanodiol a partir de glicose pode ser obtida através da série de etapas a seguir. Esta série é representativa de

uma série de processos conhecidos dos técnicos no assunto. A glicose é convertida em uma série de etapas por enzimas do processo glicolítico em diidroxiacetona fosfato (DHAP) e 3-fosfogliceraldeído (3-PG). O glicerol é formado em seguida através de hidrólise de DHAP em diidroxiacetona (DHA) seguida por redução, ou redução de DHAP em glicerol-3-fosfato (G3P) seguida por hidrólise. A etapa de hidrólise pode ser catalisada por qualquer quantidade de fosfatases celulares, que são conhecidamente não-específicas em relação aos seus substratos, ou a atividade pode ser introduzida no hospedeiro através de recombinação. A etapa de redução pode ser catalisada por uma enzima hospedeira ligada a NAD^+ (ou NADP^+) ou a atividade pode ser introduzida no hospedeiro através de recombinação. É notável que o regulon *dha* contém um glicerol desidrogenase (E.C. 1.1.1.6) que catalisa a reação reversível da Equação 3.



[00158] O glicerol é convertido em 1,3-propanodiol através do intermediário 3-hidróxi-propionaldeído (3-HPA), como foi descrito em detalhes acima. O intermediário 3-HPA é produzido a partir de glicerol, Equação 1, por uma enzima desidratase que pode ser codificada pelo hospedeiro ou pode ser introduzida no hospedeiro através de recombinação. Esta desidratase pode ser glicerol desidratase (E.C. 4.2.1.30), diol desidratase (E.C. 4.2.1.28) ou qualquer outra enzima capaz de catalisar esta transformação. A glicerol desidratase, mas não o diol desidratase, é codificada pelo regulon *dha*. O 1,3-propanodiol é produzido a partir de 3-HPA, Equação 2, por uma enzima hospedeira ligada a NAD^+ (ou NADP^+) ou a atividade pode ser introduzida no hospedeiro através de recombinação. Esta reação final na produção de 1,3-propanodiol pode ser catalisada por 1,3-propanodiol desidrogenase (E.C. 1.1.1.202) ou outros

álcoois desidrogenases.

MUTAÇÕES E TRANSFORMAÇÕES QUE AFETAM A CANALIZAÇÃO DE CARBONO

[00159] Uma série de microorganismos mutantes que compreende variações no processo de produção de 1,3-propanodiol será útil na presente invenção. Mutações que bloqueiam processos alternativos para intermediários do processo de produção de 1,3-propanodiol também seriam úteis para a presente invenção. A eliminação de glicerol quinase, por exemplo, evita que glicerol, formado a partir de G3P através da ação de G3P fosfatase, seja reconvertido em G3P à custa de ATP. Além disso, a eliminação de glicerol desidrogenase (tal como *gldA*) evita que glicerol, formado a partir de DHAP através da ação de glicerol-3-fosfato desidrogenase dependente de NADH, seja convertido em diidroxiacetona. Mutações podem ser dirigidas através de um gene estrutural, de forma a impedir ou aumentar a atividade de uma atividade enzimática ou podem ser dirigidas através de um gene regulador, incluindo regiões promotoras e sítios de ligação de ribossomos, de forma a modular o nível de expressão de uma atividade enzimática.

[00160] Desta forma, contempla-se que transformações e mutações podem ser combinadas de forma a controlar atividades enzimáticas específicas para o aumento da produção de 1,3-propanodiol. Encontra-se, portanto, dentro do escopo da presente invenção antecipar modificações de um catalisador de células inteiras que geram aumento da produção de 1,3-propanodiol.

[00161] A presente invenção utiliza um processo preferido de produção de 1,3-propanodiol a partir de um substrato de açúcar, em que o fluxo de carbono se move de glicose para DHAP, G3P, glicerol, 3-HPA e, finalmente, para 1,3-propanodiol. As linhagens de produção da presente invenção foram elaboradas para maximizar a eficiência metabólica do processo através da incorporação de várias mutações deletérias que evitam o desvio de carbono

para compostos não-produtivos. Glicerol pode ser desviado da conversão em 3HPA através de transformação em DHA ou G3P através de glicerol desidrogenase ou glicerol quinase, conforme discutido acima. Conseqüentemente, as linhagens de produção da presente invenção contêm mutações deletérias nos genes *gldA* e *glpK*. De forma similar, DHAP pode ser desviado em 3-PG por triosefosfato isomerase, de forma que o microorganismo de produção do presente também contenha uma mutação deletéria neste gene. O método do presente incorpora adicionalmente uma enzima desidratase para a conversão de glicerol em 3HPA, que funciona em conjunto com o fator de reativação, codificado por *orfX* e *orfZ* do regulon *dha*. Embora a conversão do 3HPA em 1,3-propanodiol seja tipicamente obtida através de 1,3-propanodiol oxidorreductase, o método do presente utiliza uma atividade catalítica não-específica que produz maiores títulos e rendimentos do produto final, 1,3-propanodiol. Neste processo, são atingidos títulos de 1,3-propanodiol de pelo menos 10 g/l, em que são esperados títulos de 200 g/l.

[00162] Alternativamente, um processo aprimorado de produção de 1,3-propanodiol pode utilizar glicerol ou diidroxiacetona como substrato, em que o processo compreende apenas os três últimos substratos, glicerol → 3-HPA → 1,3-propanodiol. Neste processo, a oxidorreductase é novamente eliminada em favor da atividade catalítica não-específica (esperada como sendo álcool desidrogenase), mas a necessidade de mutações deletérias é anulada pelas considerações energéticas da adição de glicerol à cultura. Desta forma, são atingidos títulos de processo de 1,3-propanodiol de pelo menos 71 g/l, em que são esperados títulos de 200 g/l.

[00163] De forma similar, encontra-se dentro do escopo da presente invenção fornecer mutantes de microorganismos do tipo selvagem que tenham sido modificados através da deleção ou mutação da atividade de *dhaT* para criar produtores aprimorados de 1,3-propanodiol. Microorganismos,

por exemplo, que contêm naturalmente todos os elementos do regulon *dha*, podem ser manipulados de forma a desativar o gene *dhaT* que codifica a atividade de 1,3-propanodiol oxidorreductase. Espera-se que esses microorganismos produzam rendimentos e títulos mais altos de 1,3-propanodiol, mediados pela presença de uma atividade catalítica endógena, esperada como sendo álcool desidrogenase. Exemplos desses microorganismos incluem, mas não se limitam a, *Klebsiella sp.*, *Citrobacter sp.* e *Clostridium sp.*

MEIOS E SUBSTRATOS DE CARBONO

[00164] Os meios de fermentação na presente invenção devem conter substratos de carbono apropriados. Os substratos apropriados podem incluir, mas sem limitar-se a monossacarídeos tais como glicose e frutose e oligossacarídeos, tais como lactose ou sacarose.

[00165] Na presente invenção, o substrato de carbono preferido é glicose.

[00166] Além de uma fonte de carbono apropriada, os meios de fermentação devem conter minerais apropriados, sais, cofatores, tampões e outros componentes, conhecidos dos técnicos no assunto, apropriados para o crescimento das culturas e promoção do processo enzimático necessário para a produção de 1,3-propanodiol. Dá-se atenção específica aos sais de Co (II) e/ou vitamina B₁₂ ou seus precursores.

[00167] Adenosil-cobalamina (coenzima B₁₂) é um cofator essencial para a atividade de desidratase. A síntese de coenzima B₁₂ é encontrada em procariontes, alguns dos quais são capazes de sintetizar o composto “*de novo*”, tais como *Escherichia blattae*, espécies de *Klebsiella*, espécies de *Citrobacter* e espécies de *Clostridium*, enquanto que outras podem desempenhar reações parciais. *E. coli*, por exemplo, não pode fabricar a estrutura de anel de corrina, mas é capaz de catalisar a conversão de

cobinamida em corrinóide e pode introduzir o grupo 5'-desoxiadenosila. Desta forma, sabe-se na técnica que um precursor de coenzima B₁₂, tal como vitamina B₁₂, precisa ser fornecido em fermentações de *E. coli*.

[00168] Adições de vitamina B₁₂ a fermentações de *E. coli* podem ser agregadas continuamente, sob velocidade constante ou em etapas, de forma a coincidir com a geração de massa celular, ou podem ser agregadas em adições de dose única ou múltipla. As razões preferidas entre vitamina B₁₂ (mg) alimentada e massa celular (OD₅₅₀) são de 0,06 a 0,60. As razões preferidas entre vitamina B₁₂ (mg) alimentada e massa celular (OD₅₅₀) são de 0,12 a 0,48.

[00169] Embora a vitamina B₁₂ seja adicionada ao *E. coli* transformado de acordo com a presente invenção, contempla-se que outros microorganismos, capazes de biossíntese de B₁₂ “*de novo*”, também serão células de produção apropriadas e a adição de B₁₂ a estes microorganismos será desnecessária.

CONDIÇÕES DE CULTURA

[00170] Tipicamente, as células são cultivadas a 35°C em meios apropriados. Os meios de crescimento apropriados na presente invenção são meios comuns preparados comercialmente, tais como caldo Luria Bertani (LB), caldo Sabouraud Dextrose (SD) ou caldo de meio de levedura (YM). Outros meios de crescimento sintéticos ou definidos podem também ser utilizados e o meio apropriado para o crescimento do microorganismo específico será conhecido pelos técnicos no assunto de microbiologia ou ciência da fermentação. O uso de agentes conhecidos por modularem a repressão de catabólitos direta ou indiretamente, tais como 2':3'-monofosfato de adenosina cíclico, pode também ser incorporado aos meios reacionais. De forma similar, o uso de agentes conhecidos por modularem atividades enzimáticas (tais como metil viológeno) que geram o aumento da produção de 1,3-propanodiol pode ser empregado em conjunto ou como alternativa a manipulações genéticas.

[00171] Faixas de pH apropriadas para a fermentação são de pH 5,0 a pH 9,0, em que pH 6,0 a pH 8,0 são preferidos como condição inicial.

[00172] As reações podem ser realizadas sob condições aeróbicas ou anaeróbicas, em que as condições aeróbicas, anóxicas ou anaeróbicas são preferidas com base nas necessidades do microorganismo.

[00173] Fermentações de bateladas alimentadas podem ser realizadas com alimentação de carbono, tal como glicose, limitada ou em excesso.

FERMENTAÇÕES CONTÍNUAS OU POR BATELADAS

[00174] O processo da presente invenção emprega um método de fermentação por bateladas. A fermentação por bateladas clássica é um sistema fechado em que a composição dos meios é ajustada no início da fermentação e não está sujeita a alterações artificiais durante a fermentação. Desta forma, no início da fermentação, os meios são inoculados com o(s) microorganismo(s) desejado(s) e permite-se que ocorra a fermentação sem qualquer adição ao sistema. Tipicamente, entretanto, fermentação por “bateladas” é batelada em relação à adição de fonte de carbono e freqüentemente são feitas tentativas de controle de fatores tais como pH e concentração de oxigênio. Em sistemas por bateladas, as composições de biomassa e metabólitos do sistema mudam constantemente até o momento em que a fermentação é suspensa. Dentro de culturas em bateladas, as células moderam através de uma fase de retardamento estático até uma fase de alto crescimento logarítmico e, finalmente, para uma fase estacionária, em que a velocidade de crescimento é reduzida ou suspensa. Caso não sejam tratadas, as células na fase estacionária eventualmente morrerão. As células na fase logarítmica, geralmente, são responsáveis pela maior parte da geração de produto final ou intermediário.

[00175] Uma variação do sistema de bateladas padrão é o

sistema de bateladas alimentadas. Os processos de fermentação por bateladas alimentadas também são apropriados na presente invenção e compreendem um sistema por bateladas típico, com exceção de que o substrato é adicionado em partes à medida que progride a fermentação. Os sistemas de bateladas alimentadas são úteis quando a repressão dos catabólitos é capaz de inibir o metabolismo das células e quando for desejável ter quantidades limitadas de substrato nos meios. A medição da concentração real de substratos em sistemas de bateladas alimentadas é difícil e, portanto, estimada com base nas mudanças de fatores mensuráveis, tais como pH, oxigênio dissolvido e pressão parcial de gases residuais, tais como CO₂. Fermentações por bateladas e por bateladas alimentadas são comuns e bem conhecidas na técnica. Exemplos podem ser encontrados em Brock, acima.

[00176] Embora a presente invenção seja realizada em modo de bateladas, contempla-se que o método seria adaptável a métodos de fermentação contínua. Fermentação contínua é um sistema aberto em que um meio de fermentação definido é adicionado continuamente a um biorreator e quantidade igual de meio condicionado é removida simultaneamente para processamento. A fermentação contínua, geralmente, mantém as culturas em densidade alta constante, em que as células encontram-se principalmente em fase de crescimento logarítmico.

[00177] A fermentação contínua permite a modulação de um fator ou qualquer quantidade de fatores que afetem o crescimento celular ou a concentração de produto final. Um método manterá, por exemplo, um nutriente limitador tal como a fonte de carbono ou o nível de nitrogênio em uma velocidade fixa e permitirá a moderação de todos os demais parâmetros. Em outros sistemas, uma série de fatores que afetam o crescimento pode ser alterada continuamente enquanto que a concentração celular, medida pela turbidez dos meios, é mantida constante. Sistemas contínuos lutam para

manter condições de crescimento em estado estável e, desta forma, a perda de células devido à deposição dos meios deve ser equilibrada em relação a velocidade de crescimento celular na fermentação. Métodos de modulação de nutrientes e fatores de crescimento para processos de fermentação contínua, bem como métodos de maximizar a velocidade de formação de produto, são bem conhecidos na técnica de microbiologia industrial e uma série de métodos é detalhada por Brock, acima.

[00178] Contempla-se que a presente invenção pode ser realizada utilizando-se processos em bateladas, processos bateladas alimentadas ou contínuos e que qualquer modo conhecido de fermentação seria apropriado. Além disso, contempla-se que as células podem ser imobilizadas sobre um substrato na forma de catalisadores de células inteiras e submetidas a condições de fermentação para a produção de 1,3-propanodiol.

IDENTIFICAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL

[00179] Métodos de purificação de 1,3-propanodiol a partir de meios de fermentação são conhecidos na técnica. Propanodíóis podem ser obtidos, por exemplo, a partir de meios celulares submetendo-se a mistura reacional à extração com um solvente orgânico, destilação e cromatografia em coluna (Patente US 5.356.812). Um solvente orgânico particularmente bom para este processo é cicloexano (Patente US 5.008.473).

[00180] 1,3-Propanodiol pode ser identificado diretamente submetendo-se os meios à análise por cromatografia líquida de alta precisão (HPLC). É preferido na presente invenção um método em que os meios de fermentação são analisados sobre uma coluna de troca iônica analítica utilizando-se uma fase móvel de 0,01N de ácido sulfúrico de forma isocrática.

MÉTODOS GERAIS E MATERIAIS

[00181] Os procedimentos para fosforilações, ligações e transformações são bem conhecidos na técnica. As técnicas apropriadas para

uso nos exemplos a seguir podem ser encontradas em Sambrook, J. et al., acima.

[00182] Os materiais e métodos apropriados para a manutenção e crescimento das culturas bacterianas são bem conhecidos na técnica. Os métodos apropriados para uso nos exemplos a seguir podem ser encontrados em *Manual of Methods for General Bacteriology* (Phillipp Gerhardt, R.G.E. Murray, Ralph N. Costilow, Eugene W. Nester, Willis A. Wood, Noel R. Krieg e G. Briggs Phillips, eds.), Sociedade Norte-Americana de Microbiologia, Washington DC, Estados Unidos (1994) ou Thomas D. Brock em *Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology*, 2ª edição (1989), Sinauer Associates Inc., Sunderland MA, Estados Unidos. Todos os reagentes e materiais utilizados para o crescimento e manutenção de células bacterianas foram obtidos através da Aldrich Chemicals (Milwaukee WI, Estados Unidos), DIFCO Laboratories (Detroit MI, Estados Unidos), GIBCO/BRL (Gaithersburg MD, Estados Unidos) ou Sigma Chemical Company (St. Louis MO, Estados Unidos), a menos que especificado em contrário.

[00183] O significado das abreviações é o seguinte: “h” indica hora(s), “min” indica minuto(s), “seg” indica segundo(s), “d” indica dia(s), “ml” indica mililitros, “l” indica litros, 50 amp são 50 µg/ml de ampicilina e LB-50 amp é caldo Luria-Bertani contendo 50 µg/ml de ampicilina.

[00184] Nas tabelas, são utilizadas as abreviações a seguir. “Con.” é conversão, “Sel.” é seletividade com base em carbono e “nd” é não detectado.

[00185] As linhagens e vetores utilizados e construídos nos exemplos a seguir são relacionadas no quadro abaixo:

Nome	Nome alternativo	Fenótipo
FM5		
RJF10		FM5 glpK-
KLP23		FM5 glpK- gldA-

Nome	Nome alternativo	Fenótipo
WO2001012833 A2		
KLndh81		FM5 glpk- gldA- ndh-
KLpts7		FM5 glpk- gldA- ndh- ptsHlcr- KmR
KlgalP-trc		FM5 glpk- gldA- ndh- ptsHlcr- KmR galPp-trc
KLGG		FM5 glpk- gldA- ndh- ptsHlcr- KmR galPp-trc glkp-trc
KLGG Δ arcA		FM5 glpk- gldA- ndh- ptsHlcr- KmR galPp-trc glkp-trc arcA-
KLGG Δ arcA Δ edd	FMP	FM5 glpk- gldA- ndh- ptsHlcr- KmR galPp-trc glkp-trc arcA- edd-
FMP selecionado	FMP':Km	FM5 glpk- gldA- ndh- ptsHlcr- KmR galPp-trc glkp-trc* arcA- edd-
FMP':Km 1.5gapA		FM5 glpk- gldA- ndh- ptsHlcr- KmR galPp-trc glkp-trc* arcA- edd- gapAp-1.5
FMP' 1.5 gapA		FM5 glpk- gldA- ndh- ptsHlcr- galPp-trc glkp-trc* arcA- edd- gapAp-1.5
FMP' 1.5 gapA Δ mgsA		FM5 glpk- gldA- ndh- ptsHlcr- galPp-trc glkp-trc* arcA- edd- gapAp-1.5mgsA-
FMP' 1.5 gap Δ mgs 1.6ppc	Triplo	FM5 glpk- gldA- ndh- ptsHlcr- galPp-trc glkp-trc* arcA- edd- gapAp-1.5 mgsA-ppcp-1.6
1.6 btuR triplo		FM5 glpk- gldA- ndh- ptsHlcr- galPp-trc glkp-trc* arcA- edd- gapAp-1.5 mgsA- ppcp-1.6 yciK-btuRp-1.6
1.6 btuR triplo 1.6yqhD		FM5 glpk- gldA- ndh- ptsHlcr- galPp-trc glkp-trc* arcA- edd- gapAp-1.5 mgsA- ppcp-1.6 yciK-btuRp-1.6 yqhC-yqhDp-1.6
1.6 btuR triplo 1.6yqhD Δ ackA-pta	Triplo Triplo	FM5 glpk- gldA- ndh- ptsHlcr- galPp-trc glkp-trc* arcA- edd- gapAp-1.5 mgsA-ppcp-1.6 yciK-btuRp-1.6 yqhC-yqhDp-1.6 ackA-pta-
Δ aldA triplo triplo		FM5 glpk- gldA- ndh- ptsHlcr- galPp-trc glkp-trc* arcA- edd- gapAp-1.5 mgsA- ppcp-1.6 yciK-btuRp-1.6 yqhC-yqhDp-1.6 ackA-pta- aldA-
Δ aldB triplo triplo		FM5 glpk- gldA- ndh- ptsHlcr- galPp-trc glkp-trc* arcA- edd- gapAp-1.5 mgsA- ppcp-1.6 yciK-btuRp-1.6 yqhC-yqhDp-1.6 ackA-pta- aldB-
Δ aldA Δ aldB triplo triplo		FM5 glpk- gldA- ndh- ptsHlcr- galPp-trc glkp-trc* arcA- edd- gapAp-1.5 mgsA- ppcp-1.6 yciK-btuRp-1.6 yqhC-yqhDp-1.6 ackA-pta- aldA- aldB-

LINHAGENS

KLP23 (documento WO 2001012833 A2);

RJ8.n (ATCC PTA-4216); e

MG 1655 ATCC 700926 (disponível comercialmente).

PLASMÍDEOS

pAH48 (documento WO 98/21340 A1);

pDT29 (documento WO 2001012833 A2);

pKP32 (documento WO 2001012833 A2);

pSYCO101 SEQ ID Nº 65;

pSYCO103 SEQ ID Nº 66;

pSYCO106 SEQ ID Nº 67; e

pSYCO109 SEQ ID Nº 68.

[00186] Os plasmídeos pKD3, pKD4, pKD13, pKD46 e pCP20 foram descritos (Datsenko e Wanner, acima). Os plasmídeos pLoxCat2 e pJW168 foram descritos (Palmeros et al., acima).

**INTEGRAÇÃO CROMOSSÔMICA PARA GENES *KNOCKOUT*, SUBSTITUIÇÕES DE
PROMOTORES E INTRODUÇÃO DE MUTAÇÕES CROMOSSÔMICAS**

[00187] Para integrar DNA a uma região específica do cromossomo, é necessária homologia do DNA a ser inserido no sítio cromossômico desejado e um marcador selecionável. É vantajoso se o marcador puder ser facilmente removido após a integração. O sistema recombinase *loxP*/Cre de fago P1 e o sistema recombinase FRT/Flp de levedura fornecem um mecanismo para remover o marcador. Os sítios *loxP* e FRT são sítios de reconhecimento para as recombinases Cre e Flp. Cre e Flp são recombinases específicas de sítios, que excisam o DNA interveniente dos sítios de reconhecimento diretamente repetidos.

[00188] O cassete de integração que contém braços homólogos ao sítio cromossômico desejado e codificam um marcador selecionável flanqueado por sítios *loxP* (Palmeros et al., *Gene* 247, 255-264 (2000)) ou FRT (Datsenko e Wanner, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 6640-6645 (2000)) é transformado em células alvo que abrigam pKD46 (Datsenko e Wanner, acima). Integrantes bem-sucedidos são selecionados pelo crescimento das células na presença do antibiótico. Em seguida, pKD46 é curado das células e os plasmídeos recombinase são então introduzidos nos integrantes para a remoção do gene antibiótico. As linhagens integradas com um cassete *loxP*

são transformadas com pJW168 que codifica Cre recombinase (Palmeros et al., acima). As linhagens que contêm um cassete de FRT são transformadas com pCP20 que codifica Flp recombinase (Datsenko e Wanner, acima). Após a remoção do marcador integrado, os plasmídeos de recombinase são curados a partir da linhagem.

[00189] A transdução de P1 *vir* foi realizada conforme descrito anteriormente (Miller, J. H., *A Short Course in Bacterial Genetics. A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria* (1992), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY, Estados Unidos).

TESTES ENZIMÁTICOS

TESTES DA ATIVIDADE DE GLICOQUINASE (GLK)

[00190] A atividade de glicoquinase (Glc) foi testada seguindo-se a conversão de glicose em glicose-6-fosfato espectrofotometricamente a 340 nm através do acoplamento da reação de glicoquinase com a de glicose-6-fosfato desidrogenase (E.C. 1.1.1.49). O teste continha 0,5 mM de NADP, 5 mM de ATP, 5 mM de MgCl e duas unidades de glicose-6-fosfato desidrogenase em 100 mM de tampão de fosfato, pH 7,2. Testes alternativos podem ser encontrados em T. E. Barman, *Enzyme Handbook* (1985), Springer-Verlag, Berlim, Alemanha.

TESTE DA ATIVIDADE DE GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO DESIDROGENASE

[00191] Teste da atividade de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase foi medido em extratos livres de células pelo surgimento de NADH. Um sobrenadante livre de células ultracentrifugado (50.000 x g, 1 h, 4°C) foi parcialmente purificado utilizando uma coluna de troca iônica antes do teste. O teste continha 0,2 mM de gliceraldeído-3-fosfato, 2,5 mM de NAD⁺, 2 mM de EDTA, 5 mM de cisteamina, 20 mM de fosfato de potássio e 40 mM de trietanolamina em pH 8,9. Testes alternativos podem ser encontrados em T.E. Barman, acima.

TESTE DA ATIVIDADE DE FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASE (PPC)

[00192] A atividade de fosfoenolpiruvato carboxilase (Ppc) foi medida em extratos livres de células por um teste acoplado (Flores e Gancedo, *FEBS Lett.* 412, 531-534 (1997)). Este método envolveu a incubação à temperatura ambiente de uma amostra de extrato livre de células ultracentrifugada (50.000 x g, 1 h, 4°C) em uma cuba que continha 0,22 mM de NADH, 1,1 mM de fosfoenolpiruvato (PEP), 0,25 mM de acetil-CoA e 6 U de malato desidrogenase (MDH) em 0,1 M de tampão Tris/HCl, pH 8,5, com 11 mM de bicarbonato de sódio e 11 mM de sulfato de magnésio, em um volume total de 1,0 ml. Uma velocidade de base da reação enzimática e NADH foi determinada em primeiro lugar a 340 nm na ausência de PEP. O segundo substrato, PEP, foi adicionado em seguida e a mudança de absorbância ao longo do tempo foi adicionalmente monitorada. A atividade Ppc foi definida através da subtração da velocidade de base da velocidade bruta. Testes alternativos podem ser encontrados em T. E. Barman, acima.

TESTES DE ENZIMAS DESIDRATASE

[00193] A atividade desidratase em extratos livres de células foi determinada utilizando-se glicerol ou 1,2-propanodiol como substrato. Tipicamente, extratos livres de células foram preparados através de rompimento celular utilizando-se uma prensa francesa seguida por centrifugação dos fragmentos celulares. O teste, com base na reação de aldeídos com metilbenzo-2-tiazolono hidrazona, foi descrito por Forage e Foster (*Biochim. Biophys. Acta* 569, 249 (1979)).

[00194] Honda et al., (*J. Bacteriol.* 143, 1458 (1980)) descrevem um teste que mede a reativação de desidratases. A atividade de desidratase foi determinada em células inteiras toluenizadas, com e sem ATP, utilizando-se glicerol ou 1,2-propanodiol como substrato. A reativação foi determinada através da razão entre a formação de produto com e sem a adição de ATP. A

formação de produto (3-HPA ou propionaldeído quando glicerol ou 1,2-propanodiol for utilizado como substrato, respectivamente) foi medida diretamente, utilizando-se HPLC, ou indiretamente, utilizando o reagente metilbenzo-2-tiazolono hidrazona. Alternativamente, a formação de produto foi determinada através do acoplamento da conversão do aldeído ao seu álcool correspondente, utilizando-se álcool desidrogenase ligada por NADH e monitorando o desaparecimento de NADH.

TESTES DE 1,3-PROPANODIOL OXIDORREDUCTASE

[00195] A atividade de 1,3-propanodiol oxidorredutase, às vezes denominada 1,3-propanodiol desidrogenase, foi determinada para extratos livres de células em solução ou em placas de gel utilizando-se 1,3-propanodiol e NAD⁺ como substratos (Johnson e Lin, *J. Bacteriol.* 169, 2050 (1987)). Alternativamente, a conversão de 3-HPA e NADH em 1,3-propanodiol e NAD⁺ foi determinada pelo desaparecimento de NADH. O teste em placas de gel possui a vantagem potencial de separar a atividade de 1,3-propanodiol oxidorredutase (*dhaT*) da atividade de álcool desidrogenases não-específica em virtude da separação por tamanho. Os pesos moleculares nativos de 1,3-propanodiol oxidorredutases (*dhaT*) de *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae* e *Clostridium pasteurianum* são excepcionalmente grandes, da ordem de 330.000 a 440.000 daltons. *Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus buchneri* contêm 1,3-propanodiol oxidorredutases associadas a desidratase com propriedades similares às de 1,3-propanodiol oxidorredutases conhecidas (*dhaT*).

TESTES DA ATIVIDADE DE GLICEROL-3-FOSFATO DESIDROGENASE

[00196] Foi utilizado um procedimento conforme modificado abaixo a partir de um método publicado por Bell et al., (*J. Biol. Chem.* 250, 7153 (1975)). Este método envolveu a incubação de uma amostra de extrato livre de células em uma cuba que continha 0,2 mM de NADH, 2,0 mM de

diidroxiacetona fosfato (DHAP) e enzima em 0,1 M de tampão Tris/HCl, pH 7,5, com 5 mM de DTT, em um volume total de 1,0 ml a 30°C. Uma velocidade de base da reação enzimática e NADH foi determinada, primeiramente, a 340 nm por pelo menos 3 minutos. O segundo substrato, DHAP, foi adicionado em seguida e a mudança de absorbância ao longo do tempo foi monitorada adicionalmente por pelo menos 3 minutos. A atividade de G3PDH foi definida através da subtração da velocidade de base da velocidade bruta.

TESTE DA ATIVIDADE DE GLICEROL-3-FOSFATASE

[00197] O teste de atividade enzimática foi realizado incubando-se o extrato com um substrato de fosfato orgânico em tampão bis-Tris ou MES e de magnésio, pH 6,5. O substrato utilizado foi fosfato de l- α -glicerol ou fosfato de d,l- α -glicerol. As concentrações finais dos reagentes no teste são: tampão (20 mM, bis-Tris ou 50 mM de MES); $MgCl_2$ (10 mM); e substrato (20 mM). Caso o total de proteína na amostra fosse baixo e nenhuma precipitação visível ocorresse com resfriamento brusco em ácido, a amostra seria convenientemente testada na cuba. Este método envolveu a incubação de uma amostra de enzima em uma cuba que continha 20 mM de substrato (50 μ l, 200 mM), 50 mM de MES, 10 mM de tampão $MgCl_2$, pH 6,5. O volume final do teste de fosfatase foi de 0,5 ml. A amostra que contém enzima foi adicionada à mistura reacional; o conteúdo da cuba foi misturado e a cuba foi colocada, em seguida, em banho de água corrente a $T = 37^\circ C$ por de 5 a 120 minutos, o período de tempo dependendo de se a atividade de fosfatase na amostra de enzima variou de 2 a 0,02 U/ml. A reação enzimática foi resfriada bruscamente através da adição do reagente molibdato ácido (0,4 ml). Após a adição do reagente Fiska SubbaRow (0,1 ml) e água destilada (1,5 ml), a solução foi misturada e mantida em desenvolvimento. Após 10 minutos, para permitir o desenvolvimento total das cores, a absorbância das amostras foi lida a 660 nm utilizando espectrofotômetro Cary 219 UV/vis. A quantidade de fosfato inorgânico liberada foi comparada com uma curva

padrão preparada através do uso de solução padrão de fosfato inorgânico (0,65 mM) e da preparação de 6 padrões com concentrações finais de fosfato inorgânico variando de 0,026 a 0,130 $\mu\text{mol/ml}$.

TESTE DA ATIVIDADE DE GLICEROL QUINASE

[00198] Uma quantidade apropriada de enzima, tipicamente um extrato bruto livre de células, foi adicionada a uma mistura reacional contendo 40 mM de ATP, 20 mM de MgSO_4 , 21 mM de glicerol uniformemente marcada com ^{13}C (99%, Cambridge Isotope Laboratories) e 0,1 M de Tris-HCl, pH 9, por 75 minutos a 25°C. A conversão de glicerol em glicerol-3-fosfato foi detectada através de NMR ^{13}C (125 MHz): glicerol (63,11 ppm, δ , $J = 41$ Hz e 72,66 ppm, t, $J = 41$ Hz); glicerol-3-fosfato (62,93 ppm, δ , $J = 41$ Hz; 65,31 ppm, br d, $J = 43$ Hz; e 72,66 ppm, dt, $J = 6, 41$ Hz).

TESTE DE GLICEROL DESIDROGENASE LIGADA POR NADH

[00199] A atividade de glicerol desidrogenase ligada por NADH (*gldA*) em extratos livres de células de linhagens de *E. coli* foi determinada após a separação de proteínas através de eletroforese em gel de poliácridamida não-desnaturante. A conversão de glicerol mais NAD^+ em diidroxiacetona mais NADH foi acoplada à conversão de brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) a um formazan com coloração escura, utilizando metossulfato de fenazina (PMS) como mediador (Tang et al., *J. Bacteriol.* 140, 182 (1997)).

[00200] Uma eletroforese foi realizada em duplicata através de procedimentos padrão utilizando géis nativos (8 a 16% TG, 1,5 mm, géis com 15 linhas da Novex, San Diego CA, Estados Unidos). O glicerol residual foi removido dos géis através de 3 lavagens com 50 mM de Tris ou tampão de carbonato de potássio, pH 9 por 10 minutos. Os géis em duplicata foram desenvolvidos, com e sem glicerol (concentração final de cerca de 0,16 M), em 15 ml de solução de teste que contém 50 mM de Tris ou carbonato de potássio, pH 9, 60 mg de sulfato de amônio, 75 mg de NAD^+ , 1,5 mg de MTT e 0,5 mg de PMS.

[00201] A presença ou ausência de atividade de glicerol desidrogenase ligada por NADH em linhagens de *E. coli* (*gldA*) também foi determinada, seguindo uma eletroforese em gel de poliacrilamida, através de reação com anticorpos policlonais preparados para purificar glicerol desidrogenase de *K. pneumoniae* (*dhaD*).

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL

ANÁLISE DE HPLC DE PRODUTOS DE FERMENTAÇÃO

[00202] A conversão de glicose em 1,3-propanodiol foi monitorada através de HPLC. Análises foram realizadas utilizando cromatografia padrão. Um método apropriado utilizou um sistema HPLC da Waters Alliance empregando detecção RI. Amostras foram injetadas em uma coluna Aminex HPX87H (7,8 mm x 300 mm, Biorad, Hercules CA, Estados Unidos) equipada com coluna prévia de Cartucho Refill Cátion H (4,6 mm x 30 mm, Biorad, Hercules CA, Estados Unidos), temperatura controlada a 50°C, utilizando 5 mM de H₂SO₄ como fase móvel em velocidade de fluxo de 0,4 ml/min. O sistema foi calibrado semanalmente em relação a padrões de concentração conhecida. Tipicamente, os tempos de retenção de glicose, glicerol, 1,3-propanodiol e ácido acético foram de 12,7 min, 19,0 min, 25,2 min e 21,5 min, respectivamente.

ANÁLISE GC/MS DE MÉTODOS DE FERMENTAÇÃO

[00203] A produção de 1,3-propanodiol foi confirmada através de GC/MS. Foram realizadas análises utilizando materiais e técnicas padrão disponíveis para os técnicos no assunto de GC/MS. Um método apropriado utilizou um cromatógrafo a gás Hewlett Packard 5890 Série II acoplado a um detetor seletivo de massa Hewlett Packard 5971 Série (EI) e uma coluna HP-INNOWax (30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme). O tempo de retenção e o espectro de massa de 1,3-propanodiol gerado foram comparados com o de 1,3-propanodiol autêntico (*m/e*: 57, 58).

[00204] Um método alternativo de GC/MS envolveu a derivação da

amostra. A 1,0 ml de amostra (tal como sobrenadante de cultura), foram adicionados 30 µl de ácido perclórico concentrado (70% v/v). Após a mistura, a amostra foi congelada e liofilizada. Uma mistura 1:1 de bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida: piridina (300 µl) foi adicionada ao material liofilizado, misturada vigorosamente e colocada a 65°C por uma hora. A amostra foi clarificada de material insolúvel através de centrifugação. O líquido resultante foi repartido em duas fases, das quais a superior foi utilizada para análise. A amostra foi cromatografada em uma coluna DB-5 (48 m, 0,25 mm de diâmetro interno, 0,25 µm de espessura de filme; da J&W Scientific) e o tempo de retenção e espectro de massa do derivado de 1,3-propanodiol obtido a partir de sobrenadantes de cultura foram comparados com os obtidos a partir de padrões autênticos. Os espectros de massa de 1,3-propanodiol derivado de TMS contêm os íons característicos de 205, 177, 130 e 115 AMU.

COMPOSIÇÃO DO MEIO

[00205] Meio TM2 (TM2) é uma receita de base à qual são adicionados fonte de carbono (tipicamente glicose, a 20 g/l ou 40 g/l), antibióticos apropriados e outros componentes. O meio TM2 contém os componentes a seguir: K₂HPO₄ (13,6 g/l), KH₂PO₄ (13,6 g/l), MgSO₄·7H₂O (2 g/l), monoidrato de ácido cítrico (2 g/l), citrato de amônio férrico (0,3 g/l), (NH₄)₂SO₄ (3,2 g/l), extrato de levedura (5 g/l), solução de elementos traço (1 ml). O pH é ajustado em 6,8. A solução de elementos traço contém: ácido cítrico H₂O (4,0 g/l), MnSO₄·H₂O (3,0 g/l), NaCl (1,0 g/l), FeSO₄·7H₂O (0,10 g/l), CoCl₂·6H₂O (0,10 g/l), ZnSO₄·7H₂O (0,10 g/l),

[00206] CuSO₄·5H₂O (0,010 g/l), H₃BO₃ (0,010 g/l) e Na₂MoO₄·2H₂O (0,010 g/l).

[00207] O meio TM3 (TM3) é idêntico ao meio TM2, exceto por conter 0,5 g/l de extrato de levedura.

[00208] O meio LB (LB) contém 5 g/l de extrato de levedura, 10 g/l de

triptona e 10 g/l de NaCl. As placas LB (ou LA) são meio LB + 2% de Agar. O meio 2YT (2YT) contém 10 g/l de extrato de levedura, 16 g/l de triptona e 10 g/l de NaCl. Caldo de soja com glicose (SBG 1%) contém 10 g/l de Soytone (Difco), 5 g/l de extrato de levedura, 10 g/l de NaCl e 10 g/l de glicose.

PROTOCOLO DE FERMENTAÇÃO (14 L)

[00209] Culturas em frascos de agitação de todas as linhagens descritas (KLP23, RJ8.n, MB 1655) foram cultivadas nos meios 2YT ou LB contendo os antibióticos apropriados, conforme detalhado nos exemplos, para fazer a cultura prévia para inoculação dos fermentadores. As culturas foram iniciadas a partir de frascos de sementes congeladas preparadas com glicerol a 15% como crioprotetor ou a partir de uma única colônia cultivada em placas LA novas com 50 mg/l de espectinomicina. As culturas iniciadas com um frasco congelado foram cultivadas em 500 ml do meio especificado em um frasco de dois litros; quando uma única colônia foi utilizada para iniciar a cultura prévia, ela foi colocada em 30 ml do meio especificado em um frasco (erlenmeyer - baffled flask) de 250 ml. As culturas foram incubadas a 34°C e sob agitação a 300 rpm até atingir-se OD₅₅₀ (densidade ótica) de cerca de 1,0 AU (unidade de absorbância) e utilizados para semear o fermentador. Em alguns casos, um fermentador de sementes foi utilizado para gerar uma cultura prévia maior para inocular um fermentador de produção. Os fermentadores de sementes foram, geralmente, idênticos a fermentadores de produção, exceto pelo fato da vitamina B₁₂ não ser adicionada ao tanque de sementes. Detalhes sobre os procedimentos para utilização de fermentadores de sementes são descritos nos exemplos pertinentes.

[00210] Fermentadores de produção e sementes foram preparados com o mesmo meio, que contém KH₂PO₄ (7,5 g/l), MgSO₄·7H₂O (2 g/l), monoidrato de ácido cítrico (2 g/l), citrato de amônio férrico (0,3 g/l), CaCl₂·2H₂O (0,2 g/l), ácido sulfúrico (98%; 1,2 ml/l), Mazu DF204 (0,4 ml/l) como antiespumante, extrato de levedura (5 g/l), solução de elementos traço (10 ml/l). A solução de elementos traço

contém: ácido cítrico H₂O (4,0 g/l), MnSO₄H₂O (3,0 g/l), NaCl (1,0 g/l), FeSO₄7H₂O (0,10 g/l), CoCl₂6H₂O (0,10 g/l), ZnSO₄7H₂O (0,10 g/l), CuSO₄5H₂O (0,010 g/l), H₃BO₃ (0,010 g/l) e Na₂MoO₄2H₂O (0,010 g/l). Após a esterilização, o pH foi ajustado em 6,8 com NH₄OH a 20-28% e foram realizadas adições de glicose (até 10 a 25 g/l de uma solução de 60 a 67% (p/p)) e foram elaborados os antibióticos apropriados (vide exemplos específicos para detalhes). O volume do fermentador após a inoculação foi de 6 litros.

[00211] Um fermentador de tanque agitado de 14 litros foi preparado com o meio descrito acima. A temperatura foi controlada a 34°C e amônia aquosa (20 a 28% em peso) foi utilizada para controlar o pH a 6,8. A contrapressão foi controlada 50 KPa (0,5 barg) e o controle de dO ajustado a 5%. Exceto por excursões menores, a concentração de glicose foi mantida entre 0 g/l e 25 g/l com alimentação de 60 a 67% (p/p). Adições de vitamina B₁₂ e quaisquer outras mudanças no procedimento geral descrito na presente invenção são observadas nos exemplos.

[00212] O rendimento molar, seja na forma de fração ou percentual, representa: (mol de glicerol produzido + mol de 1,3-propanodiol produzido)/(mol de glicose consumido). O rendimento em peso, geralmente, fornecido na forma de percentual, representa: (gramas de 1,3-propanodiol produzido)/(gramas de glicose consumida).

EXEMPLOS

EXEMPLO 1

CONSTRUÇÃO DE LINHAGENS DE *E. COLI* NADH DESIDROGENASE II MENOS (Δ NDH) PARA

A PRODUÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL

CONSTRUÇÃO DE KLNDH81

[00213] Uma mutação de *ndh* foi obtida através da interrupção da região de codificação com um cassete *loxP511*. O gene *ndh* (para referência, vide GenBank, Acesso nºU00096), com regiões flanqueadoras *upstream* (a jusante) e

downstream (a montante), foi amplificado por PCR a partir de *E. coli* MG1655 e clonado. O cassete *ndh* foi digerido com *Stu* I, cortando-se aproximadamente no meio do gene, e um cassete de *loxP511*-Cat-*loxP511* foi clonado no sítio com o gene *cat* em orientação contrária em relação ao gene *ndh*. O cassete de *loxP511*-Cat-*loxP511* foi obtido a partir do plasmídeo pLoxCat27 (SEQ ID Nº 1) através de digestão com *Spe* I e *EcoR* V, seguido por preenchimento para gerar extremidades planas e purificação em gel do fragmento de 1,1 kb. O sítio *loxP511* é uma variante do sítio *loxP* (Palmeros et al., acima). O cassete *ndh::Cat* foi amplificado por PCR e eletroporado em células competentes KLP23, criando a linhagem KLndh81::Cm. O marcador de cloranfenicol foi removido pela Cre recombinase (Palmeros et al., acima), deixando 96 pb de sequência interrompida contendo um sítio *loxP511*. Esta linhagem foi denominada KLndh81. Alternativamente, uma mutação *ndh* foi obtida através da interrupção da região de codificação com um cassete Cat sem sítios *loxP* para gerar a linhagem KLNDH413.

CONSTRUÇÃO DE RJ8.N

[00214] Um cassete contendo sequência flanqueadoras *ndh* e *loxP511*- Cat-*loxP511* de KLndh81::Cm foi amplificado por PCR e clonado em pUniV5-His TOPO (Invitrogen) para criar pAH111. O cassete *ndh-loxP511*-Cat-*loxP511* de pAH111 foi integrado à linhagem RJ8/pKD46. Linhagens recombinantes foram selecionadas para determinar a resistência a cloranfenicol. A integração bem-sucedida do cassete em *ndh* foi confirmada através de PCR. O marcador de cloranfenicol foi removido utilizando-se Cre recombinase (Palmeros et al., acima), criando a linhagem RJ8.n.

EXEMPLO 2

COMPARAÇÃO DA PRODUÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL E GLICEROL COM AS LINHAGENS DE *E. COLI* KLP23/PAH48/PDT29 E KLP23/PAH48/PAK32

[00215] A linhagem KLP23 foi transformada com os plasmídeos pAH48 e pDTP29 ou pKP32. A produção de 1,3-propanodiol (e

glicerol) foi determinada em fermentadores de 14 litros, conforme descrito em Métodos Gerais. As culturas prévias para cada fermentação foram preparadas utilizando frascos congelados, descongelados e cultivados em 500 ml de 2YT com 200 mg/l de carbenicilina e 50 mg/l de espectinomicina. O conteúdo total do frasco foi utilizado para inocular o fermentador. O fermentador foi operado a 35°C e um ponto de ajuste d6 de 10%; todos os demais parâmetros de controle são conforme descritos em Métodos Gerais. A estratégia da vitamina B₁₂ para cada fermentação é detalhada abaixo.

FERMENTAÇÃO COM KLP23/PAH48/PDT29

[00216] Neste exemplo, vitamina B₁₂ (0,075 g/l, 500 ml) foi alimentada, iniciando 3 horas após a inoculação, sob velocidade de 16 ml/h. Um resumo de fermentação representativo da conversão de glicose em 1,3-propanodiol (1,3-PD) utilizando linhagem de *E. coli* KLP23/pAH48/pDT29 é fornecido na Tabela 2.1. O rendimento de 1,3-propanodiol foi de 24% em peso (g de 1,3-propanodiol/g de glicose consumida) e foi obtido um título de 68 g/l de 1,3-propanodiol.

TABELA 2.1

RESUMO DE FERMENTAÇÃO REPRESENTATIVO DA CONVERSÃO DE GLICOSE EM

1,3-PROPANODIOL (1,3-PD) UTILIZANDO LINHAGEM DE *E. COLI*

KLP23/PAH48/PDT29

Tempo (h)	OD ₅₅₀ (AU)	DO (%)	Glicose (g/l)	Glicerol (g/l)	1,3-PD (g/l)
0	0	150	12,9	0,0	0
6	17	80	8,3	3,1	1
12	42	53	2,8	12,5	9
18	98	9	5,7	12,6	32
24	136	11	32,8	12,0	51
30	148	10	12,3	13,3	62
32	152	11	12,5	14,3	65
38	159	11	1,5	17,2	68

[00217] Resultados similares foram obtidos com alimentação

idêntica de vitamina B₁₂ em duas vezes a concentração ou adições de mistura de vitamina B₁₂ ao longo do período de tempo da fermentação. O título mais alto obtido foi de 77 g/l.

FERMENTAÇÃO APRIMORADA COM KLP23/PAH48/PAK32

[00218] Um resumo de fermentação representativo da conversão de glicose em 1,3-propanodiol (1,3-PD) utilizando linhagem de *E. coli* KLP23/pAH48/pKP32 é fornecido na Tabela 2.2. Vitamina B₁₂ (0,150 g/l, 500 ml) foi alimentada, iniciando 3 horas após a inoculação, sob velocidade de 16 ml/h. Após 36 horas, cerca de dois litros de caldo de fermentação foram purgados, a fim de permitir a adição contínua de alimentação de glicose. O rendimento de 1,3-propanodiol foi de 26% em peso (gramas de 1,3-propanodiol/gramas de glicose consumida) e foi obtido um título de 112 g/l de 1,3-propanodiol.

TABELA 2.2

RESUMO DE FERMENTAÇÃO REPRESENTATIVA DA CONVERSÃO APRIMORADA DE GLICOSE EM 1,3-PROPANODIOL (1,3-PD) UTILIZANDO LINHAGEM DE *E. COLI*

KLP23/PAH48/PAK32

Tempo (h)	OD550 (AU)	DO (%)	Glicose (g/l)	Glicerol (g/l)	1,3-PD (g/l)
0	0	148	12,8	0,0	0
6	22	84	6,9	3,3	0
12	34	90	9,7	10,4	7
18	66	43	9,3	5,9	24
24	161	9	0,2	2,5	46
30	200	10	0,2	6,0	67
36	212	10	1,2	9,7	88
42	202	2	0,1	15,5	98
48	197	12	1,2	23,8	112

[00219] Resultados similares foram obtidos com uma alimentação idêntica de vitamina B₁₂ sob metade da concentração ou adições de mistura de vitamina B₁₂ ao longo do decorrer da fermentação. O

título mais alto obtido foi de 114 g/l.

EXEMPLO 2A

COMPARAÇÃO DA PRODUÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL E GLICEROL COM LINHAGENS DE *E. COLI* RJ8/PAH48/PDT29 E RJ8/PAH48/PAH48/PKP32

[00220] Culturas prévias de RJ8/pAH48pDT29 e RJ8/pAH48/pKP32 foram preparadas utilizando frascos congelados, descongelados e cultivados em 500 ml de 2YT com 200 mg/l de carbenicilina e 50 mg/l de espectinomicina. O conteúdo total do frasco foi utilizado para inocular o fermentador. O fermentador foi operado a 35°C e sob ponto de ajuste d6 de 10%; todos os demais parâmetros de controle são conforme descrito em Métodos Gerais. RJ8/pAH48/pKP32 é idêntico a RJ8/pAH48/pDT29, exceto pela deleção de *dhaT*. A estratégia de vitamina B₁₂ para cada fermentação é detalhada abaixo.

FERMENTAÇÃO COM RJ8/PAH48/PDT29

[00221] Um resumo de fermentação representativa da conversão de glicose em 1,3-propanodiol (1,3-PD) utilizando linhagem de *E. coli* RJ8/pAH48/pDT29 é fornecido na Tabela 2A.1. Vitamina B₁₂ foi fornecida na forma de adições de mistura de 2, 16 e 16 mg em 2, 8 e 26 horas, respectivamente. O rendimento de 1,3-propanodiol foi de 35% em peso (gramas de 1,3-propanodiol/gramas de glicose consumida) e foi obtido um título de 50,1 g/l de 1,3-propanodiol.

TABELA 2A.1

RESUMO DE FERMENTAÇÃO REPRESENTATIVA DA CONVERSÃO DE GLICOSE EM 1,3-PROPANODIOL (1,3-PD) UTILIZANDO LINHAGEM DE *E. COLI* RJ8/PAH48/PDT29

Tempo (h)	OD ₅₅₀ (AU)	DO (%)	Glicose (g/l)	Glicerol (g/l)	1,3-PD (g/l)
0	0	140	10,6	0,1	0,0
6	5	107	11,1	0,5	0,4
10	16	90	8,5	1,7	1,3
14	25	86	1,8	2,4	5,9
19	38	53	3,5	5,9	15,4

Tempo (h)	OD ₅₅₀ (AU)	DO (%)	Glicose (g/l)	Glicerol (g/l)	1,3-PD (g/l)
25	53	38	0,1	9,2	26,7
31	54	10	4,5	7,4	39,0
37	37	23	17,2	6,0	45,0
43	21	13	9,9	7,7	50,1

FERMENTAÇÃO APRIMORADA COM RJ8/PAH48/PKP32

[00222] Um resumo de fermentação representativa da conversão de glicose em 1,3-propanodiol (1,3-PD) utilizando linhagem de *E. coli* RJ8/pAH48/pKP32 é fornecido na Tabela 2A.2. Vitamina B₁₂ foi fornecida na forma de adições de misturas de 48 e 16 mg a cerca de 26 e 44 horas, respectivamente. O rendimento de 1,3-propanodiol foi de 34% em peso (gramas de 1,3-propanodiol/gramas de glicose consumida) e foi obtido um título de 129 g/l de 1,3-propanodiol.

TABELA 2A.2

RESUMO DE FERMENTAÇÃO REPRESENTATIVA DA CONVERSÃO APRIMORADA DE GLICOSE EM 1,3-PROPANODIOL (1,3-PD) UTILIZANDO LINHAGEM DE *E. COLI*

RJ8/PAH48/PKP32

Tempo (h)	OD ₅₅₀ (AU)	DO (%)	Glicose (g/l)	Glicerol (g/l)	1,3-PD (g/l)
0	0	150	12,6	0,1	0
6	12	113	6,0	2,6	0
12	24	99	0,0	10,6	0
18	51	76	2,4	28,9	0
24	78	82	2,4	44,2	5
30	114	70	3,8	26,9	33
36	111	72	0,0	20,0	57
42	139	65	0,1	21,9	69
48	157	36	0,1	22,4	79
55	158	25	0,2	21,4	94
64	169	14	0,1	15,8	113
72	169	12	0,1	13,4	119
74	162	14	0,1	14,8	129

PRODUÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL E GLICEROL COM LINHAGEM DE *E. COLI*

RJ8.N/PAH48/PKP32

[00223] A linhagem RJ8.n foi transformada com os plasmídeos pAH48 e pKP32. A produção de 1,3-propanodiol (e glicerol) foi determinada em

fermentadores de 14 l, conforme descrito em Métodos Gerais. Um frasco congelado, descongelado de RJ8.n/pAH48/pKP32 foi transferido para 500 ml de LB com 200 mg/l de carbenicilina e 50 mg/l de espectinomicina para preparar a cultura prévia. A cultura foi transferida para um fermentador de sementes e cultivada por 16 horas antes que um litro da cultura fosse transferido para o fermentador de produção. Naquele momento, o OD₅₅₀ havia atingido mais de 50 AU e 30 g/l de glicerol haviam se acumulado no caldo. Os dois fermentadores, de sementes e de produção, foram operados a 35°C e em ponto de ajuste d6 de 10%; todos os demais parâmetros de controle são conforme descritos em Métodos Gerais.

[00224] Vitamina B₁₂ foi adicionada ao tanque de produção em misturas de 16 mg após 12 h, 17,3 h, 22,8 h e 27,5 h. O título final foi de 112,7 g/l de 3G e o rendimento de massa foi de 31,6%.

EXEMPLO 3

CONSTRUÇÃO E DESEMPENHO EM FRASCO DE AGITAÇÃO DE LINHAGEM DE *E. COLI* COM DELEÇÃO NO REGULADOR GLOBAL *ARC A*

[00225] Uma deleção de *arcA* (como referência, vide GenBank, Número de Acesso U00096) foi realizada através da substituição de 0,6 kb da região de codificação com o cassete FRT-CmR-FRT de pKD3. Um cassete de substituição foi amplificado com o par de primers SEQ ID N° 2 e SEQ ID N° 3, utilizando pKD3 como modelo. O primer SEQ ID N° 2 contém 41 pb de homologia para a extremidade 5' de *arcA* e 20 pb de homologia para pKD3. O primer SEQ ID N° 3 contém 42 pb de homologia para a extremidade 3' de *arcA* e 20 pb de homologia para pKD3. O produto de PCR foi purificado em gel e eletroporado em células competentes MG1655/pKD46. Linhagens recombinantes foram selecionadas em placas LB com 12,5 mg/l de cloranfenicol. A deleção do gene *arcA* foi confirmada através de PCR, utilizando o par de primers SEQ ID N° 4 e SEQ ID N° 5. A linhagem do tipo

selvagem gera um produto de PCR de 0,7 kb, enquanto a linhagem recombinante gera um produto de PCR de 1,1 kb característico. A linhagem foi denominada MG1655 Δ arcA::Cm. Um lisato P1 foi preparado e utilizado para mover a mutação para a linhagem KLndh81, para formar KLndh81 Δ arcA::Cm.

[00226] A linhagem KLndh81 Δ arcA::Cm e linhagem de controle KLndh81 foram eletrotransformadas com o plasmídeo pSYCO101. Uma colônia de cada linhagem foi incubada por 10 horas em meio LB com 50 mg/l de espectinomicina. Um volume de 200 μ l destas culturas foi transferido em seguida para um frasco Erlenmeyer (baffled erlenmeyer flask) de 250 ml contendo 10 ml de meio TM2 com 40 g/l de glicose, 50 mg/l de espectinomicina e 2 mg/l de vitamina B₁₂. Os frascos foram incubados a 300 rpm e 34°C por 40 horas. Os resultados na Tabela 3 demonstram que a mutação *arcA* aumenta o rendimento molar de glicerol e a produção de 1,3-propanodiol.

TABELA 3

PRODUÇÃO DE GLICEROL E 1,3-PROPANODIOL EM *E. COLI* CONTROLE E LINHAGENS DE Δ ARC A::CM

Linhagem	Glicerol (g/l)	1,3-Propanodiol (g/l)	OD 550 nm	Rendimento molar (mol/mol)
KLndh81 pSYCO101	5,8	10,7	29,2	0,87
KLndh81 Δ arcA pSYCO101	6,8	11,4	25,9	0,95

EXEMPLO 4

CONSTRUÇÃO DE LINHAGENS DE *E. COLI* COM SISTEMA DE FOSFOTRANSFERASE MENOS (PTS⁻) COM PROMOTORES TRC QUE CONTROLAM OS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE UM COTRANSPORTADOR DE PRÓTONS E GALACTOSE (*GALP*) E GLICOQUINASE (*GLK*)

CONSTRUÇÃO DE UM CASSETE DE *loxP*-CAT-*loxP*-Trc (pTRCm42)

[00227] DNA linear foi obtido a partir do plasmídeo pTrc99a (Pharmacia)

[00228] digerido com *Hind*III e *Nco*I, preenchido com T4 DNA

polimerase, circularizado e transformado em *E. coli* TOP-10 (Invitrogen, Carlsbad CA, Estados Unidos). Após a seleção em placas Luria-agar contendo 50 mg/l de carbenicilina, o plasmídeo resultante (pTrc1) foi purificado e submetido a análise de enzimas de restrição para confirmar que a região de DNA originalmente presente entre *HindIII* e *NcoI* estava ausente.

[00229] O sítio *BspM1* exclusivo em pTrc1 (*upstream* da região -35 do promotor *trc*) foi utilizado para inserir um cassete contendo um gene de resistência a cloranfenicol (CAT) flanquado por sítios *loxP*. DNA linear foi obtido a partir de pTrc1 digerido com *BspM1*, purificado em gel utilizando um kit de extração em gel QIAquick (QIAGEN), preenchido com T4 DNA polimerase e ligado a um cassete *loxP*-Cat-*loxP*. O cassete *loxP*-Cat-*loxP* foi obtido a partir do plasmídeo pLoxCat1, vide SEQ ID Nº 6, através de digestão com *Stu1* e *BamH1*. O pLoxCat1 é similar a pLoxCat2 (Palmeros et al., acima). A mistura de ligação foi transformada em *E. coli* TOP-10 (Invitrogen) e realizou-se uma seleção em placas Luria-agar contendo 50 mg/l de carbenicilina e 20 mg/l de cloranfenicol. Um plasmídeo foi obtido e realizou-se uma análise de enzimas de restrição. Dois plasmídeos, contendo *loxP*-Cat-*loxP*-Trc com o cassete *loxP*-Cat-*loxP* na mesma orientação e na orientação oposta em relação ao promotor *trc*, foram denominados pTrCm41 e pTrCm42, respectivamente.

CONSTRUÇÃO DE UM MODELO DE SUBSTITUIÇÃO DE PROMOTOR *TRC* PARA *GALP*

(PR6KGALP)

[00230] Um cassete de DNA contendo o promotor *trc* e o operador *lac* com um cassete *loxP*-CAT-*loxP* *upstream* foi amplificado por PCR a partir de pTrCm42, utilizando o par de primers SEQ ID Nº 7 e SEQ ID Nº 8. O par de primers incorpora 40 pb de homologia para a região *upstream* de *galP* a cada extremidade do produto de PCR. Os parâmetros de PCR foram de 95°C por um minuto; 55°C por um minuto; 72°C por 2 minutos, 30 ciclos utilizando *Taq* polimerase (Roche). O produto foi subclonado em Echo pUni/His5 R6K

(Invitrogen) para gerar o plasmídeo pR6KgalP.

CONSTRUÇÃO DE UM MODELO DE SUBSTITUIÇÃO DE PROMOTOR *TRC* PARA *GLK*

(PR6GLK)

[00231] Um cassete de DNA que contém o promotor *trc* e o operador *lac* com um cassete *loxP*-CAT-*loxP* *upstream* foi amplificado a partir de pTrCm42 através de PCR utilizando o par de primers SEQ ID Nº 9 e SEQ ID Nº 10. O par de primers SEQ ID Nº 9 e SEQ ID Nº 10 incorpora 39 (com deleção de uma base) e 40 pb de homologia, respectivamente, à região *upstream* de *glk* para cada extremidade do produto de PCR. Os parâmetros de PCR foram de 95°C por um minuto; 55°C por um minuto; 72°C por 2 minutos, 30 ciclos utilizando *Taq* polimerase (Roche). O produto foi subclonado em Echo pUni/His5 R6K (Invitrogen) para gerar o plasmídeo pR6Kglk.

CONSTRUÇÃO DE UMA LINHAGEM DE *E. COLI* Δ PTSH/CRR (KLPTS7)

[00232] Um derivado PTS menos (Δ *ptsH/crr*) de linhagem de *E. coli* KLndh81 foi obtido através de transdução P1 *vir* utilizando um derivado de *E. coli* linhagem NF9 como doador (Flores et al., *Nature Biotechnology* 14, 620-623 (1996)). A transdução substitui o operon que compreende *ptsH*, *ptsI* e *crr* por um marcador de resistência ao antibiótico canamicina (Levy et al., *Gene* 86, 27-33 (1990)) para gerar a linhagem KLpts7. Sobre placas com agar MacConkey (lactose-) + 1% glicose, KLpts7 exibe um fenótipo de colônia branca.

SUBSTITUIÇÃO DO PROMOTOR *GALP* NATURAL PELO PROMOTOR *TRC* SINTÉTICO

(KLGALP-TRC)

[00233] Um produto de amplificação de PCR que compreende um cassete de *loxP*-Cat-*loxP*-Trc e incorporação de 40 pb de homologia para a região *upstream* de *galP* (para referência, vide GenBank, Acesso nº U00096) a cada extremidade foi gerado utilizando *rTth* RNA polimerase (Perkin Elmer), pR6KgalP como o model e o par de primers SEQ ID Nº 7 e SEQ ID Nº 8. O

cassete de integração amplificado por PCR foi transformado em células KLpts7 eletrocompetentes contendo pKD46 para integração utilizando o sistema Vermelho lambda, conforme descrito em Datsenko e Wanner, acima. Realizou-se uma seleção em placas LB contendo 10 mg/l de cloranfenicol. A integração bem sucedida deste casete substitui a região 38 a 181 pb *upstream* do códon de início *galP* ATG (para referência, vide GenBank, Acesso nº U00096) com um cassete *loxP*-Cat-*loxP*-Trc (SEQ ID Nº 11) para gerar a linhagem KLpts::*galP*-trc. A integração foi confirmada através de análise por PCR utilizando o par de primers SEQ ID Nº 7 e SEQ ID Nº 8 (amplificando o sítio de integração para gerar um produto de 1,4 kb) e o par de primers SEQ ID Nº 12 e SEQ ID Nº 13 (amplificando o sítio de integração, incluindo regiões *upstream* e *downstream*, para gerar um produto de 2,1 kb). Os parâmetros de PCR foram de 95°C por um minuto; 55°C por um minuto; 72°C por 2 minutos, 30 ciclos utilizando *Taq* polimerase ou *rTth* polimerase. KLpts::*galP*-trc, sobre placas em agar MacConkey (lactose⁻) + 1% glicose, exibe um fenótipo de colônia vermelha clara. O marcador de cloranfenicol foi removido conforme descrito por Palmeros et al., acima. A remoção foi confirmada através de análise por PCR utilizando o par de primers SEQ ID Nº 12 e SEQ ID Nº 13 (para gerar um produto de 1,1 kb) e a linhagem resultante foi denominada KL*galP*-trc.

SUBSTITUIÇÃO DO PROMOTOR *GLK* NATURAL PELO PROMOTOR *TRC* SINTÉTICO

(KLGG)

[00234] Um produto de amplificação de PCR que compreende um cassete *loxP*-Cat-*loxP*-Trc e que incorpora cerca de 40 pb de homologia para a região *glk upstream* (para referência, vide GenBank, Acesso nº U00096) para cada extremidade foi gerado utilizando *rTth* RNA polimerase (Perkin Elmer), pR6K*glk* como modelo e o par de primers SEQ ID Nº 9 e SEQ ID Nº 10. O cassete de integração amplificado por PCR foi transformado em células KL*galP*-trc eletrocompetentes contendo pKD46 para integração, utilizando o sistema

Vermelho lambda conforme descrito acima. Realizou-se seleção em placas LB contendo 10 mg/l de cloranfenicol. A integração bem-sucedida deste cassete substitui a região 40 a 137 pb *upstream* do códon de início de *glk* ATG (para referência, vide GenBank, Acesso nº U00096) com um cassete *loxP*-Cat-*loxP*-Trc (SEQ ID Nº 11). A integração foi confirmada através de análise de PCR utilizando o par de primers SEQ ID Nº 14 e SEQ ID Nº 15 (amplificando o sítio de integração, incluindo regiões *upstream* e *downstream*, para gerar um produto de 2,4 kb). Em placas sobre agar MacConkey (lactose-) agar + 1% glicose, as colônias exibem uma coloração vermelha escura, o que indica aumento da conversão de glicose em ácido em comparação com o (KLgalP-trc) parental. O marcador de cloranfenicol foi removido conforme descrito acima e análise de PCR subsequente (utilizando o par de primers SEQ ID Nº 14 e SEQ ID Nº 15 para gerar um produto de 1,3 kb) gerou a linhagem KLGG.

DELEÇÃO DO GENE *ARCA*, QUE CODIFICA UM REGULADOR GLOBAL (KLGG Δ ARCA)

[00235] Um lisato P1 da linhagem MG1655 Δ arcA::Cm foi preparado e utilizado para mover a mutação para a linhagem KLGG. Um clone resistente a cloranfenicol resultante, KLGG Δ arcA::Cm, foi verificado através de PCR genômico, para garantir que a mutação estava presente. O marcador de resistência a cloranfenicol foi removido utilizando a FLP recombinase (Datsenko e Wanner, acima) e esta linhagem foi denominada KLGG Δ arcA.

DELEÇÃO DO GENE *EDD*, QUE CODIFICA GENE 6-FOSFOGLICONATO DESIDRASE (KLGG Δ ARCA Δ EDD, TAMBÉM DENOMINADO FMP)

[00236] A deleção de *edd* (para referência, vide GenBank, Acesso nº U00096) foi obtida através da substituição de 1,7 kb da região de codificação por um cassete *loxP*-cat-*loxP* de pLoxCat2. Um cassete de substituição foi amplificado com o par de primers SEQ ID Nº 16 e SEQ ID Nº 17. O primer SEQ ID Nº 16 contém 80 pb de homologia para a extremidade 5' de *edd* e 18 pb de homologia para o modelo pLoxCat2. O primer SEQ ID Nº 17 contém 78 pb de

homologia para a extremidade 3' de *edd* e 19 pb de homologia para pLoxCat2. O produto de PCR foi purificado em gel e eletroporado em células competentes KLGG Δ arcA/pKD46. Linhagens recombinantes foram selecionadas em placas LB com 12,5 mg/l de cloranfenicol. A deleção do gene *edd* foi confirmada através de PCR utilizando o par de primers SEQ ID Nº 18 e SEQ ID Nº 19. A linhagem do tipo selvagem gera um produto de PCR de 2,2 kb enquanto a recombinante gera um produto de PCR de 1,6 kb característico. Esta linhagem foi denominada KLGG Δ arcA Δ edd::cat. O marcador de cloranfenicol foi removido utilizando a Cre recombinase (Palmeros et al., acima) e esta linhagem foi denominada KLGG Δ arcA Δ edd ou, alternativamente, FMP.

SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA LINHAGEM DE FMP QUE EXIBE VELOCIDADE AUMENTADA DE CONSUMO DE GLICOSE

[00237] Invariavelmente, as células que compreendem Δ ptsHlcr, a substituição do promotor *trc* do promotor *galP* natural e a substituição do promotor *trc* do promotor *gk* natural (todas as três modificações conforme descrito no Exemplo 4) exibiram inicialmente crescimento lento. Também invariavelmente, uma seleção subsequente (conforme descrito abaixo) gera um derivado de crescimento mais rápido. A atividade de glicoquinase, testada a partir de extratos livres de células, foi tipicamente três vezes mais alta para o derivado de crescimento mais rápido em comparação com o parental de crescimento mais lento.

[00238] A linhagem FMP de *E. coli*, transformada com o plasmídeo pSYCO103, foi cultivado em um fermentador de 14 litros essencialmente conforme descrito no Exemplo 2. Frascos para armazenamento a -80°C (padrões de glicerol a 15%) foram feitos ao longo da fermentação. Uma placa LB foi riscada a partir da amostra tomada após 33 horas (OD₅₅₀ foi 30,7 AU) e colônias isoladas foram recuperadas e denominadas "FMP/pSYCO103 selecionado". Colônias isoladas foram obtidas

de forma similar a partir de linhagem FMP que não contém plasmídeo e denominadas “FMP selecionado”.

[00239] Os genes *galP* e *gk*, incluindo a região promotora *trc* introduzida, foram amplificados por PCR a partir de duas colônias de “FMP/pSYCO103 selecionado” e uma colônia de “FMP selecionado”, utilizando o par de primers SEQ ID Nº 12 e SEQ ID Nº 13 e o par de primers SEQ ID Nº 14 e SEQ ID Nº 15, respectivamente. Análise de seqüências nestas três amostras foi realizada utilizando os mesmos primers. Em cada caso, o gene *galP* e a região promotora permaneceram inalterados da linhagem parental, enquanto o gene *gk* e a região promotora continham mudança de pares base isolados idênticos em comparação com a linhagem parental. Os dois isolados de “FMP selecionado/pSYCO103” e um isolado de “FMP selecionado” continham a seqüência identificada como SEQ ID Nº 20 na região -35 a -10 do promotor *trc* que controla a expressão de *gk* em comparação com a seqüência parental correspondente SEQ ID Nº 21. A linhagem originada de “FMP selecionado” da qual foi obtida a seqüência *galP* e *gk* foi denominada linhagem FMP’::Km.

EXEMPLO 5

EXEMPLOS COMPARATIVOS DE FERMENTAÇÕES DE GLICOSE EM 1,3-PROPANODIOL

UTILIZANDO LINHAGENS FMP/PSYCO103 E FMP’::KM/PSYCO103

[00240] As linhagens FMP e FMP’::Km foram transformadas com o plasmídeo pSYCO103. A produção de 1,3-propanodiol foi determinada em fermentadores de 14 litros, conforme descrito em Métodos Gerais, com as diferenças a seguir nos parâmetros de controle para fermentadores. Um frasco congelado descongelado de FMP/pSYCO103 foi transferido para 500 ml de 2YT com 50 mg/l de espectinomicina para preparar a cultura prévia. O ponto de ajuste de dO foi de 15%. Vitamina B₁₂ foi adicionada ao fermentador em misturas de 16 mg após 30, 43 e 51 horas.

[00241] Um frasco congelado descongelado de FMP':Km/pSYCO103 foi transferido para 500 ml de SBG 1% com 50 mg/l de espectinomicina para preparar a cultura prévia. Vitamina B₁₂ foi adicionada ao fermentador em misturas de 16 mg após 21, 40 e 40,5 horas.

[00242] A Figura 1 demonstra que a produção de 1,3-propanodiol por FMP':Km/pSYCO103 é mais rápida que por FMP/pSYCO103.

EXEMPLO 6

ELABORAÇÃO DA EXPRESSÃO ALTERADA DE GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO

DESIDROGENASE (GAP_A) EM LINHAGENS DE *E. COLI* PARA A PRODUÇÃO DE 1,3-

PROPANODIOL A PARTIR DE GLICOSE

REDUÇÃO DA EXPRESSÃO DE GAP_A ATRAVÉS DE ALTERAÇÃO DO CÓDON DE INÍCIO

[00243] O nível de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, Gap_A, foi reduzido através da substituição do códon de início de ATG do gene *gapA* com um códon de início GTG ou TTG.

[00244] A sequencia flanqueadora *upstream* e *downstream* do gene *gapA* de *E. coli* foi amplificado através de PCR a partir de linhagem de *E. coli* MG1655, utilizando o par de primers SEQ ID N° 22 e SEQ ID N° 23. O produto de PCR foi clonado diretamente a partir da reação de PCR em pCR-BluntII-TOPO (Invitrogen) para formar pDT50. Os plasmídeos pDT50 e pLitmus 28 (New England Biolabs, Inc.) foram digeridos com *SphI* e *BamHI* e o fragmento de gene *gapA* e vetor, respectivamente, foram purificados em gel e ligados. O plasmídeo resultante, pDT51, foi transformado em *E. coli* TOP10 (Invitrogen).

[00245] Os plasmídeos mutantes de *gapA* foram construídos utilizando o Método de Mutagênese Dirigida ao sítio por Um Dia Stratagene QuickChange (Stratagene, La Jolla CA, Estados Unidos). O modelo de plasmídeo, pDT51, foi misturado com o par de primers SEQ ID N° 24 e SEQ ID N° 25, para criar a mutação GTG do par de primers SEQ ID N° 26 e SEQ ID N°

27, para criar a mutação TTG. Após amplificação por PCR, as reações foram digeridas com *DpnI* para remover o modelo de plasmídeo e deixar apenas os plasmídeos amplificados. Os plasmídeos foram transformados em seguida em *E. coli* TOP10 (Invitrogen).

[00246] As construções *gapA*-GTG e *gapA*-TTG foram amplificadas por PCR utilizando o par de primers SEQ ID Nº 22 e SEQ ID Nº 23. Os produtos de PCR foram eletroporados na linhagem knockout *gapA*, KLP23A112. A linhagem de *E. coli* KLP23A112 foi construída através de transdução de KLP23 com um lisato de fago P1 obtido a partir de *E. coli* DS112 (Centro de Estoque Genético de *E. coli*), linhagem com deleção de *gapA* que contém um marcador CmR. Recombinantes foram selecionados para crescimento em placas LB sem a adição de glicose e sensibilidade a cloranfenicol. O seqüenciamento confirmou a integração bem-sucedida das mutações GTG e TTG. As linhagens que sofreram mutação foram denominadas KLPAGTG e KLPATTG, respectivamente. A medição das atividades de GapA nas linhagens KLPAGTG e KLPATTG demonstrou que os níveis de GapA foram de 4% e inferiores a 1% da linhagem controle KLP23, respectivamente.

[00247] As linhagens KLP23, KLPAGTG e KLPATTG foram transformadas com o plasmídeo pSYCO101 e testadas para determinar a produção de 1,3-propanodiol em meio TM2 que contém 40 g/l de glicose, 50 mg/l de espectinomicina e 1 mg/l de vitamina B₁₂. Os resultados são exibidos na Tabela 4.

TABELA 4

RESUMO DE FRASCOS DE AGITAÇÃO REPRESENTATIVOS DA CONVERSÃO DE GLICOSE EM 1,3-PROPANODIOL UTILIZANDO LINHAGENS DE *E. COLI* KLP 23/PSYCO101, KLP AGTG/PSYCO101 E KLPATTG/PSYCO101

Linhagem	Glicerol (g/l)	1,3-Propanodiol (g/l)	Rendimento molar (mol/mol)
KLP23 pSYCO101	5,8	10,7	0,87
KLPAGTG pSYCO101	0,7	1,3	0,11
KLPATTG pSYCO101	0,2	0,4	0,04

ALTERAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GAP ATRAVÉS DE SUBSTITUIÇÃO DO PROMOTOR

[00248] A substituição do promotor *gapA* natural pelo promotor 1,5 GI curto sintético (SEQ ID N° 28) foi efetuada através da substituição de 225 pb de sequência *gapA upstream* (para referência, vide GenBank, Acesso nº U00096) por FRT-CmR-FRT e um promotor elaborado. O cassete de substituição foi amplificado através de PCR com o par de primers SEQ ID N° 29 e SEQ ID N° 30 utilizando pKD3 como modelo. O primer SEQ ID N° 29 contém 39 pb de homologia para *gapA* incluindo o início ATG, contém o promotor 1.5 GI curto e contém 20 pb de homologia para o modelo pKD3. O primer SEQ ID N° 30 contém 59 pb de homologia para sequência *gapA upstream* e 21 pb de homologia para pKD3. Os produtos de PCR foram purificados em gel e eletroporados em células competentes MG1655/pKD46 para gerar MG1655 1.5gapA::Cm. Linhagens recombinantes foram selecionadas em placas LB com 12,5 mg/l de cloranfenicol. A integração bem-sucedida do cassete substituiu a região 34-258 pb *upstream* do códon de início ATG de *gapA* com um cassete promotor 1.5 GI curto FRT-CmR-FRT. Um lisato de fago P1 foi preparado e utilizado para mover a mutação para FMP'::Km. Esta linhagem foi denominada FMP'::Km 1.5gapA::Cm.

[00249] O promotor *gapA* 1.5GI curto em MG1655 1.5gapA::Cm foi substituído pelo promotor 1.20 GI curto (SEQ ID N° 31) ou o promotor 1.6 GI curto (SEQ ID N° 32). Para criar a linhagem 1.20 gapA, um cassete de substituição foi amplificado por PCR com o par de primers SEQ ID N° 33 e SEQ ID N° 34, utilizando DNA genômico de MG1655 1.5gapA::Cm como modelo. O primer SEQ ID N° 33 contém 24 pb de homologia para a região *upstream* de *gapA*. O primer SEQ ID N° 34 contém homologia para a região *upstream* de *gapA* em MG1655 1.5gapA::Cm e contém o promotor 1.20 GI curto. Para criar a linhagem 1.6gapA, um cassete de substituição foi amplificado por PCR com o par de primers SEQ ID N° 33 e SEQ ID N° 35, utilizando DNA genômico de

MG1655 1.5gapA::Cm como modelo. O primer SEQ ID N° 35 contém homologia para a região *upstream* de *gapA* em MG1655 1.5gapA::Cm e contém o promotor 1.6 GI curto. O cassete de substituição de promotor 1.20 GI curto e o cassete de substituição de promotor 1.6 GI curto foram utilizados para substituir o promotor *gapA* natural de MG1655, conforme descrito acima, para gerar as linhagens MG1655 1.20gapA::Cm e MG1655 1.6gapA::Cm, respectivamente. MG1655 1.20gapA::Cm e MG1655 1.6gapA::Cm foram utilizados para substituir o promotor *gapA* natural da linhagem FMP'::Km (utilizando transdução P1 conforme descrito acima) para gerar as linhagens FMP'::Km 1.20 gapA::Cm e FMP'::Km 1.6gapA::Cm, respectivamente.

[00250] As atividades de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase foram determinadas utilizando extratos livres de células preparados a partir das linhagens FMP'::Km 1.20gapA::Cm, FMP'::Km 1.5gapA::Cm, FMP'::Km 1.6gapA::Cm e FMP'::Km como controle. Os valores obtidos, em comparação com os do controle, foram de 10%, 25% e 140% para as linhagens FMP'::Km 1.20gapA::Cm, FMP'::Km 1.5gapA::Cm, FMP'::Km 1.6gapA::Cm, respectivamente.

[00251] As linhagens que contêm as substituições de promotor GI foram transformadas com o plasmídeo pSYCO106 e comparadas com a linhagem parental para a produção de 1,3-propanodiol em meio TM2 contendo 20 g/l de glicose, 50 mg/l de espectinomicina e 1 mg/l de vitamina B₁₂. Os resultados são exibidos na Tabela 5.

TABELA 5

RESUMO DE FRASCOS DE AGITAÇÃO REPRESENTATIVOS DE LINHAGENS DE

PROMOTOR FMP'::Km GI GAP A TRANSFORMADAS COM O PLASMÍDEO PSYCO106

Linhagem	Glicerol (g/l)	1,3-Propanodiol (g/l)	Rendimento molar (mol/mol)
FMP'::Km/pSYCO106	1,8	6,8	1,07
FMP'::Km 1.6gapA/pSYCO106	4,1	3,3	0,92
FMP'::Km 1.5gapA/pSYCO106	6,6	3,6	1,21
FMP'::Km 1.20 gapA/pSYCO106	7,6	2,8	1,26

EXEMPLO 7**REMOÇÃO DOS MARCADORES DE FMP':::Km 1.5gapA::Cm**

[00252] O marcador de cloranfenicol foi removido da linhagem FMP':::Km 1.5gapA::Cm (conforme descrito no capítulo Métodos Gerais) para gerar as linhagens FMP':::Km 1.5gapA.

[00253] O marcador de canamicina introduzido em FMP':::Km 1.5gapA em consequência da elaboração de KLndh81 PTS menos (Δ ptsHlcr) foi substituído pelo cassete FRT-Cm-FRT removível através de transdução de P1 de MG1655 Δ ptsHlcr::Cm. Uma deleção de *ptsHlcr* em MG1655 foi elaborada com um cassete de substituição amplificado com o par de primers SEQ ID Nº 54 e SEQ ID Nº 55, utilizando pKD3 como modelo. O primer SEQ ID Nº 54 contém 78 pb de homologia para a região remanescente de *ptsH* mantida no cromossomo da linhagem FMP':::Km 1.5gapA e 20 pb de homologia para pKD3. O primer SEQ ID Nº 55 contém 77 pb de homologia para a região remanescente de *cr* na linhagem FMP':::Km 1.5 gapA e 20 pb de homologia para pKD3. Os produtos de PCR foram purificados em gel e eletroporados em células competentes MG1655/pKD46. Linhagens recombinantes foram selecionadas em placas LB com 12,5 mg/l de cloranfenicol. A análise por PCR confirmou a integração do cassete. Sobre placas em agar MacConkey (lactose-) + 1% glicose, MG1655 Δ ptsHlcr::Cm exibe um fenótipo de colônia branca. Um lisato de fago P1 foi preparado e o marcador Cm foi transduzido em FMP':::Km 1.5gapA. Linhagens recombinantes foram selecionadas sobre cloranfenicol e a análise por PCR confirmou a integração bem-sucedida do cassete. O marcador de cloranfenicol foi removido utilizando a Flp recombinase e seqüenciamento (utilizando o primer SEQ ID Nº 56) confirmou a remoção do marcador de cloranfenicol. A linhagem resultante foi denominada FMP' 1.5 gapA.

EXEMPLO 8

DEMONSTRAÇÃO DO ALTO RENDIMENTO DE 1,3-PROPANODIOL A PARTIR DE GLICOSE UTILIZANDO A LINHAGEM DE *E. COLI* FMP' 1.5GAP/PSYCO106

[00254] A linhagem FMP' 1.5gapA foi transformada com o plasmídeo pSYCO106. A produção de 1,3-propanodiol e glicerol foi determinada em fermentadores de 14 litros, conforme descrito nos Métodos Gerais, com as diferenças a seguir nos parâmetros de controle para o fermentador. Um frasco congelado descongelado de FMP' 1.5gap/pSYCO106 foi transferido para 500 ml de SBG a 1% com 50 mg/l de espectinomicina para preparar a cultura prévia. Vitamina B₁₂ foi adicionada ao fermentador em misturas de 16 mg antes da inoculação e após 28 horas. A concentração final de 1,3-propanodiol foi de 129 g/l e o rendimento da massa foi de 40,2%.

EXEMPLO 9

ELABORAÇÃO DE METILGLIOXAL SINTASE (*MGS*A) MUTANTE EM *E. COLI*

[00255] As deleções de *mgsA* (para referência, vide GenBank, Acesso nº U00096) foram elaboradas através da substituição de 0,4 kb da região de codificação com o cassete FRT-Kan-FRT de pKD4. Um cassete de substituição foi amplificado por PCR com o par de primers SEQ ID Nº 36 e SEQ ID Nº 37, utilizando pKD4 como modelo. O primer SEQ ID Nº 36 contém 40 pb de homologia para a extremidade 5' de *mgsA* e 20 pb de homologia para o DNA modelo, pKD4. O primer SEQ ID Nº 37 contém 40 pb de homologia para a extremidade 3' de *mgsA* e 20 pb de homologia para pKD4. O produto de PCR foi purificado em gel e eletroporado em células competentes MG1655/pKD46. Linhagens recombinantes foram selecionadas sobre placas LB com 12,5 mg/l de canamicina. A deleção do gene *mgsA* foi confirmada através de PCR, utilizando o par de primers SEQ ID Nº 38 e SEQ ID Nº 39. A linhagem do tipo selvagem gera um produto de PCR de 1,3 kb enquanto a linhagem recombinante gera um produto de PCR de 2,4 kb característico. Esta linhagem

foi denominada MG1655 $\Delta mgsA::kan$. Após a obtenção do mutante *mgsA* em MG1655, um lisato de fago P1 foi preparado e utilizado para mover a mutação para FMP' 1.5gapA (Exemplo 8). O marcador de resistência à canamicina foi removido utilizando a FLP recombinase (Datsenko e Wanner, acima) e esta linhagem foi denominada FMP' 1.5gapA $\Delta mgsA$.

[00256] FMP' 1.5gapA $\Delta mgsA$ e seu parental foram transformados com o plasmídeo pSYCO106 para gerar FMP' 1.5gapA $\Delta mgsA$ /pSYCO106 e FMP' 1.5gapA/pSYCO106, respectivamente.

[00257] As linhagens foram testadas para determinar a produção de 1,3-propanodiol em meio TM2 contendo 20 g/l de glicose, 50 mg/l de espectinomicina e 1 mg/l de vitamina B₁₂. Os resultados são exibidos na Tabela 6.

TABELA 6

RESUMO DE FRASCOS DE AGITAÇÃO REPRESENTATIVOS DE LINHAGENS FMP'
1.5GAP/pSYCO106 E FMP' 1.5GAP Δ MGS/pSYCO106

Linhagem	Glicerol (g/l)	1,3-Propanodiol (g/l)	Rendimento molar (mol/mol)
FMP' 1.5gapA/pSYCO106	6,6	3,6	1,21
FMP' 1.5gapA Δ mgsA/pSYCO106	8,3	2,4	1,26

EXEMPLO 10

FERMENTAÇÃO DE GLICOSE EM 1,3-PROPANODIOL UTILIZANDO UMA LINHAGEM DE *E. COLI* FMP' 1.5GAP Δ MGS/pSYCO106

[00258] A linhagem FMP' 1.5gapA $\Delta mgsA$ foi transformada com o plasmídeo pSYCO106. A produção de 1,3-propanodiol (e glicerol) foi determinada em fermentadores de 14 litros conforme descrito em Métodos Gerais com as diferenças a seguir nos parâmetros de controle para fermentadores. Uma única colônia de uma placa nova (LA com 50 mg/l de espectinomicina) de FMP' 1.5gapA $\Delta mgsA$ /pSYCO106 foi transferida para 30 ml de LB com 100 mg/l de espectinomicina em um frasco de 250 ml para preparar a cultura prévia. Após

incubação a 34°C e 300 rpm até OD₅₅₀ de 1 AU, 10,8 ml da cultura foram transferidos para o fermentador. O fermentador foi conduzido com limitação de glicose durante grande parte da condução. Vitamina B₁₂ foi adicionada ao fermentador em misturas de 16 mg antes da inoculação, após 28 horas e 38 horas. A concentração final de 1,3-propanodiol foi de 130 g/l e o rendimento da massa foi de 47,5%. Uma condução com glicose mantida em excesso (0 a 20 g/l) gerou 141 g/l de 1,3-propanodiol e um rendimento de massa de 43,6%.

EXEMPLO 11

CONSTRUÇÃO DE UMA LINHAGEM DE *E. COLI* COM UM PROMOTOR ELABORADO PARA FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASE (PPC) ATRAVÉS DE TRANSFORMAÇÃO DE DNA LINEAR

[00259] A substituição do promotor *ppc* natural pelo promotor 1.6 GI curto sintético foi realizada através da substituição de 59 pb do cassete de seqüência de *ppc upstream* que contém FRT-CmR-FRT e um promotor elaborado. O produto de PCR foi amplificado com o par de primers SEQ ID N° 40 e SEQ ID N° 41, utilizando pKD3 como modelo. O primer SEQ ID N° 40 contém 80 pb de homologia para a seqüência *ppc upstream* e 20 pb de homologia para o pKD3 modelo. O primer SEQ ID N° 41 contém 39 pb de homologia para a seqüência *ppc upstream*, contém a seqüência promotora 1.6 GI curta e contém 20 pb de homologia para pKD3. Os produtos de PCR foram purificados em gel e eletroporados em células competentes MG1655/pKD46. Linhagens recombinantes foram selecionadas em placas LB com 12,5 mg/l de cloranfenicol para gerar MG1655 1.6ppc::Cm. A integração bem-sucedida do cassete substitui a região 90 a 148 pb *upstream* do início de *ppc* ATG (para referência, vide GenBank, Acesso n° U00096) com um cassete promotor 1.6 GI curto FRT-CmR-FRT. A integração à região *ppc upstream* foi confirmada pelo par de primers SEQ ID N° 40 e SEQ ID N° 41. A linhagem de tipo selvagem gera um produto de PCR de 0,2 kb enquanto a linhagem recombinante gera um produto de PCR de 1,2 kb característico. Este

produto de PCR foi seqüenciado utilizando o primer SEQ ID Nº 42, que indicou que a substituição do promotor efetivamente ocorreu. Um lisato de fago P1 foi preparado e utilizado para mover a mutação para a linhagem FMP'1.5gap Δ mgsA. Esta linhagem foi denominada FMP'1.5gap Δ mgs 1.6ppc::Cm. O marcador de resistência a cloranfenicol foi removido utilizando a FLP recombinase (Datsenko e Wanner, acima) e a linhagem resultante foi eletrotransformada com o plasmídeo pSYCO106 para gerar FMP'1.5gap Δ mgs 1.6ppc/pSYCO106.

[00260] As culturas de frasco de agitação foram utilizadas para determinar a conversão de glicose em 1,3-propanodiol em linhagens de *E. coli* FMP'1.5gap Δ mgs/pSYCO106 e FMP'1.5gap Δ mgs 1.6ppc/pSYCO106. As linhagens, cultivadas em meio LB contendo 50 mg/l de espectinomicina por 10 horas, foram utilizadas para inoculação (200 μ l) em frascos Erlenmeyer com septo de 250 ml contendo 10 ml de meio TM2, 20 g/l de glicose, 50 mg/l de espectinomicina e 2 mg/l de vitamina B₁₂. Os frascos foram incubados a 300 rpm e 34°C. Resultados representativos são fornecidos na Tabela 7. Foram observados aumento do rendimento molar e uma redução da produção de acetato com a adição da mutação 1.6ppc à linhagem parental.

TABELA 7

FRASCOS DE AGITAÇÃO PARA CONVERSÃO DE GLICOSE EM 1,3-PROPANODIOL (1,3-PD)

Linhagem	Glicerol produzido (g/l)	1,3-Propanodiol produzido (g/l)	Acetato produzido (g/l)	Rendimento molar
FMP'1.5gap Δ mgsA/pSYCO106	8,24	2,19	1,78	1,25
FMP'1.5gap Δ mgs 1.6ppc/pSYCO106	7,5	3,34	0,34	1,32

[00261] A atividade de fosfoenolpiruvato carboxilase (Ppc) foi medida a partir de extratos livres de células obtidos a partir dos frascos de agitação descritos imediatamente acima. Parcelas de células foram recolhidas em fase logarítmica intermediária, rompidas por duas passagens através de uma prensa francesa para células, centrifugadas por 15 minutos a 14.000 rpm e

ultracentrifugadas por uma hora a 50.000 rpm. O sobrenadante foi removido e utilizado como fonte de proteínas. As atividades específicas de PPC são relatadas na Tabela 8 abaixo. A substituição do promotor ppc natural pelo promotor 1.6 GI curto aumentou a atividade da enzima Ppc em 3 vezes.

TABELA 8

ATIVIDADE ESPECÍFICA DE ENZIMA PPC

Linagem	Atividade específica de fosfoenolpiruvato carboxilase (U/mg de proteína)
FMP'1.5gap ΔmsgA, pSYCO106	0,28
FMP'1.5gap Δmgs 1.6ppc, pSYCO106	0,86

EXEMPLO 11A

FERMENTAÇÃO DE GLICOSE EM 1,3-PROPANODIOL UTILIZANDO LINHAGEM DE *E. COLI*

FMP' 1.5GAPA ΔMGSA/PSYCO106

[00262] A produção de 1,3-propanodiol por FMP' 1.5gapA ΔmgsA 1.6ppc/pSYCO106 foi determinada em fermentadores de 14 litros conforme descrito em Métodos Gerais, com as diferenças a seguir nos parâmetros de controle para fermentadores. Uma única colônia de uma placa nova (LA com 50 mg/l de espectinomicina) de FMP' 1.5gapA ΔmgsA 1.6ppc/pSYCO106 foi transferida para 30 ml de LB com 100 mg/l de espectinomicina em um frasco de 250 ml para preparar a cultura prévia. Após incubação a 34°C e 300 rpm até OD₅₅₀ de 1 AU, 10,8 ml da cultura foram transferidos para o fermentador. Vitamina B₁₂ foi adicionada ao fermentador em misturas de 16 mg antes da inoculação, após 28 horas e após 38 horas. A concentração final de 1,3-propanodiol foi de 135,3 g/l e o rendimento da massa foi de 46,1%.

EXEMPLO 12

CONSTRUÇÃO DE LINHAGEM DE *E. COLI* COM UM PROMOTOR ELABORADO PARA

YCIK/BTUR ATRAVÉS DE TRANSFORMAÇÃO DE DNA LINEAR

[00263] Os genes *yciK* e *btuR* estão presentes em um único operon em *E. coli*. A substituição do promotor *yciK-btuR* natural com o

promotor 1.6 GI curto sintético foi realizada através da inserção de um cassete de 1,3 kb, *upstream* de *yciK-btuR*. O cassete de substituição, que contém FRT-CmR-FRT e um promotor elaborado, foi amplificado através de PCR com o par de primers SEQ ID Nº 43 e SEQ ID Nº 44, utilizando pKD13 como modelo. O primer SEQ ID Nº 43 contém 70 pb de homologia para a sequência *yciK-btuR upstream* e 20 pb de homologia para o modelo pKD13. O primer SEQ ID Nº 44 contém 30 pb de homologia para a sequência *yciK-btuR upstream*, contém a sequência promotora 1.6 GI curta e contém 20 pb de homologia para pKD13. Os produtos de PCR foram purificados em gel e eletroporados em células competentes MG1655/pKD46. As linhagens recombinantes foram selecionadas em placas LB com 25,0 mg/l de canamicina para gerar MG1655 1.6yciK-btuR::Km. A integração bem-sucedida do cassete resulta em inserção entre 27 pb e 28 pb *upstream* do códon de início de *yciK* ATG (para referência, vide GenBank, Acesso nº U00096) com um cassete promotor 1.6 GI curto FRT-CmR-FRT. A integração à região *yciK/btuR upstream* foi confirmada pelo par de primers SEQ ID Nº 45 e SEQ ID Nº 46. A linhagem do tipo selvagem gera um produto de PCR de 1,4 kb, enquanto a linhagem recombinante gera um produto de PCR de 2,8 kb característico. Um lisato de fago P1 foi preparado e utilizado para mover a mutação para um derivado da linhagem FMP'1.5gap Δ mgS 1.6ppc denominado Triple. Após a remoção do antibiótico, foi obtida a linhagem Triple 1.6btuR.

EXEMPLO 12A

FERMENTAÇÃO DE GLICOSE EM 1,3-PROPANODIOL UTILIZANDO A LINHAGEM DE *E.*

COLI TRIPLE 1.6BTUR/PSYCO109

[00264] A linhagem Triple 1.6btuR foi transformada com pSYCO109. A produção de 1,3-propanodiol por Triple 1.6btuR/pSYCO109 foi determinada em fermentadores de 14 litros, conforme descrito em Métodos Gerais, com as diferenças a seguir nos parâmetros de controle para

fermentação. Uma única colônia de uma placa nova (LA com 50 mg/l de espectinomicina) de Triple 1.6btuR/pSYCO109 foi transferida para 30 ml de LB com 100 mg/l de espectinomicina em um frasco de 250 ml para preparar a cultura prévia. Após incubação a 34°C e 300 rpm até OD₅₅₀ de 1 AU, 10,8 ml da cultura foram transferidos para o fermentador. Vitamina B₁₂ foi adicionada ao fermentador em misturas de 8 mg antes da inoculação, após 28 horas e após 38 horas. A concentração final de 1,3-propanodiol foi de 123 g/l e o rendimento de massa foi de 45,7%.

EXEMPLO 13

CONSTRUÇÃO DE LINHAGEM DE *E. COLI* COM UM PROMOTOR ELABORADO PARA *YQH D* ATRAVÉS DE TRANSFORMAÇÃO DE DNA LINEAR

[00265] A substituição do promotor *yqhD* natural (álcool desidrogenase) com o promotor 1.6 GI curto sintético foi realizada através da substituição de 967 pb de sequência *yqhD upstream* que inclui o gene *yqhC* com um cassete que contém FRT-CmR-FRT e um promotor elaborado. O produto de PCR foi amplificado com o par de primers SEQ ID Nº 47 e SEQ ID Nº 48, utilizando pKD3 como modelo. O primer SEQ ID Nº 47 contém 78 pb de homologia para a sequência *yqhD upstream* e 20 pb de homologia para o modelo pKD3. O primer SEQ ID Nº 48 incorpora 41 pb de homologia (com deleção de 1 pb) para a sequência *yqhD upstream*, 40 pb de homologia para a sequência promotora 1.6 GI curta e 19 pb de homologia para pKD3. Os produtos de PCR foram purificados em gel e eletroporados em células competentes MG1655/pKD46. Linhagens recombinantes foram selecionadas em placas LB com 12,5 mg/l de cloranfenicol para gerar MG1655 1.6yqhD::Cm. A integração bem-sucedida do cassete substituiu a região 50-1016 pb *upstream* do início ATG de *yqhD* (para referência, vide GenBank, Acesso nº U00096) com um cassete de promotor 1.6 GI curto FRT-CmR-FRT. Uma integração à região *yqhD upstream* foi confirmada através de seqüenciamento com o primer

SEQ ID N° 49 e indicou que a substituição do promotor efetivamente ocorreu. Um lisato de fago P1 foi preparado e utilizado para mover a mutação para a linhagem Triple 1.6btuR. Após a remoção do antibiótico (conforme descrito acima), foi obtida a linhagem Triple 1.6btuR 1.6yqhD.

EXEMPLO 13A

FERMENTAÇÃO DE GLICOSE EM 1,3-PROPANODIOL UTILIZANDO A LINHAGEM DE *E.*

***COLI* TRIPLE 1.6BTUR 1.6YQHD/PSYCO109**

[00266] A linhagem Triple 1.6btuR 1.6yqhD foi transformada com pSYCO109. A produção de 1,3-propanodiol por Triple 1.6btuR 1.6yqhD/pSYCO109 foi determinada em fermentadores de 14 litros, conforme descrito em Métodos Gerais, com as diferenças a seguir nos parâmetros de controle para fermentação. Uma única colônia de uma placa nova (LA com 50 mg/l de espectinomicina) de Triple 1.6btuR 1.6yqhD/pSYCO109 foi transferida para 30 ml de LB com 100 mg/l de espectinomicina em frasco de 250 ml para preparar a cultura prévia. Após incubação a 34°C e 300 rpm até OD₅₅₀ de 1 AU, 10,8 ml da cultura foram transferidos para o fermentador. Vitamina B₁₂ foi adicionada ao fermentador em uma única mistura de 16 mg após transcorrido um tempo de fermentação de 20,6 horas. A concentração final de 1,3-propanodiol foi de 113,3 g/l e o rendimento de massa foi de 48,8%.

EXEMPLO 14

CONSTRUÇÃO DE UMA LINHAGEM DE *E. COLI* COM UMA MUTAÇÃO DELETÉRIA EM

ACETATO QUINASE (*ACK*) E FOSFOTRANSACETILASE (*PTA*) ATRAVÉS DE

TRANSFORMAÇÃO DE DNA LINEAR

[00267] A deleção de *pta-ackA* (para referência, vide GenBank, Acesso nº U00096) foi elaborada através da substituição de 3,3 kb da região de codificação com o cassete FRT-CmR-FRT de pKD3. O cassete de substituição foi amplificado com o par de primers SEQ ID N° 50 e SEQ ID N° 51, utilizando pKD3 como modelo. O primer SEQ ID N° 50 contém 80 pb de homologia para a

extremidade 5' de *pta* e 20 pb de homologia para o DNA modelo, pKD3. O primer SEQ ID Nº 51 contém 80 pb de homologia para a extremidade 3' de *ackA* e 20 pb de homologia para pKD3. Os produtos de PCR foram purificados em gel e eletroporados em células competentes MG1655/pKD46. Linhagens recombinantes foram selecionadas em placas LB com 12,5 mg/l de cloranfenicol para gerar a linhagem MG1655 Δ ackA-pta::Cm. A deleção dos genes *pta-ackA* foi confirmada através de PCR, utilizando o par de primers SEQ ID Nº 52 e SEQ ID Nº 53. A linhagem do tipo selvagem gera um produto de PCR de 3,8 kb enquanto a linhagem recombinante gera um produto de PCR de 1,6 kb característico. Um lisato de fago P1 foi preparado e utilizado para passar a mutação para a linhagem Triple 1.6btuR 1.6yqhD para formar a linhagem Triple 1.6btuR 1.6yqhD Δ ackA-pta::Cm. O marcador de resistência a cloranfenicol foi removido utilizando a FLP recombinase (Datsenko e Wanner, acima) para gerar Triple 1.6btuR 1.6yqhD Δ ackA-pta (renomeado TripleTriple (TT)). As linhagens Triple 1.6btuR 1.6yqhD e TT foram eletrotransformadas com o plasmídeo pSYCO109.

EXEMPLO 15

MEDIÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA FOSFOTRANSACETILASE (PTA) EM LINHAGEM TRIPLE TRIPLE/PSYCO109 EM COMPARAÇÃO COM A LINHAGEM TRIPLE 1.6BTUR 1.6YQHD/PSYCO109

[00268] Fermentações com TT/pSYCO109 e Triple 1.6btuR 1.6yqhD/pSYCO109 foram conduzidas em fermentadores de 14 litros, conforme descrito nos Métodos Gerais com as diferenças a seguir nos parâmetros de controle para fermentação. Uma fermentação típica com Triple 1.6btuR 1.6yqhD/pSYCO106 foi descrita no Exemplo 13A.

[00269] Uma cultura prévia de TT/pSYCO109 foi cultivada em 30 ml de LB com 100 mg/l de espectinomicina em frasco de 250 ml até

OD₅₅₀ de cerca de 1 AU. Um fermentador de sementes preparado conforme descrito foi inoculado com 10,8 ml daquela cultura. Após 30,5 horas de tempo de fermentação, 1,2 litros da cultura foram transferidos para um fermentador de produção. Este fermentador recebeu uma única mistura de 16 mg de vitamina B₁₂ uma hora após a inoculação. A concentração final de 1,3-propanodiol em uma fermentação típica foi de 114 g/l e o rendimento foi de 48%.

[00270] Amostras de fermentação típica de Triple 1.6btuR 1.6yghD/pSYCO109 foram analisadas para determinar a atividade da enzima Pta. Foi obtida uma atividade específica de 0,4 U/mg de proteína. Amostras testadas de uma fermentação típica de TT/pSYCO109 não exibiram atividade da enzima Pta detectável.

EXEMPLO 16

ESTABILIDADE APRIMORADA DE RENDIMENTOS MOLARES EM LINHAGEM

TT/PSYCO109 EM COMPARAÇÃO COM TRIPLE 1.6BTUR 1.6YQHD/PSYCO109

[00271] Culturas de frascos de agitação em duplicata foram cultivadas com as linhagens Triple btuR 1.6 yqhD, pSYCO109 e TT pSYCO109. Após a incubação de uma colônia por 10 horas em LB + 50 mg/l de espectinomicina, 100 ml de cultura foram transferidos em 30 ml de meio TM2 com 2% de glicose, com ou sem 50 ppm de espectinomicina (dia 1). A fim de estudar a estabilidade do rendimento, um volume de 100 ml das culturas do dia 1 foi transferido após 24 horas para um volume novo de 30 ml de meios TM2 contendo 2% de glicose com ou sem 50 ppm de espectinomicina. Isso foi repetido 4 vezes. O rendimento molar foi calculado como no Exemplo 2, ao final de cada período de 24 horas, e os resultados são fornecidos abaixo na Tabela 9. A deleção de *ackA-ptA* estabiliza o rendimento molar, de forma a aumentar a produção de 1,3-propanodiol.

TABELA 9

Linhagem	Rendimento molar					
	Com (+) ou sem (-) espeticinomicina	Rend. Molar Dia 1	Rend. Molar Dia 2	Rend. Molar Dia 3	Rend. Molar Dia 4	Rend. Molar Dia 5
Triple btuR, 1.6yqhD, pSYCO109	+	1,24	1,28	1,06	0,84	0,79
TT, pSYCO109	+	1,15	1,22	1,24	1,24	1,07
Triple btuR 1.6yqhD, pSYCO109	-	1,23	1,04	0,95	0,61	0,25
TT, pSYCO109	-	1,23	1,22	1,23	1,13	1,11

EXEMPLO 17

CONSTRUÇÃO DE UMA LINHAGEM DE *E. COLI* COM MUTAÇÕES DELETÉRIAS EM ALDEÍDO DESIDROGENASES ATRAVÉS DE TRANSFORMAÇÃO DE DNA LINEAR

[00272] Uma deleção de *aldA* (para referência, vide GenBank, Acesso nº U00096) foi elaborada através da substituição de 1,3 kb da região de codificação com o cassete FRT-CmR-FRT de pKD3. O cassete foi amplificado com o par de primers SEQ ID Nº 57 e SEQ ID Nº 58 utilizando pKD3 como modelo. O primer SEQ ID Nº 57 contém 80 pb de homologia para a extremidade 5' de *aldA* e 20 pb de homologia para o DNA modelo, pKD3. O primer SEQ ID Nº 58 contém 80 pb de homologia para a extremidade 3' de *aldA* e 20 pb de homologia para pKD3. Os produtos de PCR foram purificados em gel e eletroporados em células competentes MG1655/pKD46. As linhagens recombinantes foram selecionadas em placas LB com 12,5 mg/l de cloroanfenicol. A deleção do gene *aldA* foi confirmada através de PCR, utilizando o par de primers SEQ ID Nº 59 e SEQ ID Nº 60. A linhagem de tipo selvagem gera um produto de PCR de 2,0 kb enquanto a linhagem recombinante gera um produto de PCR de 1,8 kb característico. Um lisato P1 daquela linhagem foi preparado e utilizado para mover a mutação para a linhagem TT para formar a linhagem TT Δ *aldA*::Cm. O marcador de resistência

a cloranfenicol foi removido utilizando a FLP recombinase (Datsenko e Wanner, acima) para criar TT *aldA*.

[00273] Uma deleção de *aldB* (para referência, vide GenBank, Acesso nº U00096) foi elaborada através da substituição de 1,5 kb da região de codificação com o cassete FRT-CmR-FRT do pKD3. Um cassete de substituição foi amplificado com o par de primers SEQ ID Nº 61 e SEQ ID Nº 62, utilizando pKD3 como modelo. O primer SEQ ID Nº 61 contém 80 pb de homologia para a extremidade 5' de *aldB* e 20 pb de homologia para pKD3. O primer SEQ ID Nº 62 contém 80 pb de homologia para a extremidade 3' de *aldB* e 20 pb de homologia para pKD3. Os produtos de PCR foram purificados em gel e eletroporados em células competentes MG1655/pKD46. Linhagens recombinantes foram selecionadas em placas LB com 12,5 mg/l de cloroanfenicol. A deleção do gene *aldB* foi confirmada através de PCR, utilizando o par de primers SEQ ID Nº 63 e SEQ ID Nº 64. A linhagem do tipo selvagem gera um produto de PCR de 1,5 kb, enquanto a linhagem recombinante gera um produto de PCR de 1,1 kb característico. Um lisato de P1 foi preparado e utilizado para mover a mutação para a linhagem TT para formar a linhagem TT Δ *aldB*:Cm. Um clone resistente a cloranfenicol foi verificado através de PCR genômico com o par de primers SEQ ID Nº 63 e SEQ ID Nº 64 para garantir a presença da mutação.

EXEMPLO 17A

PRODUÇÃO DE GLICEROL COM A LINHAGEM FMP' 1.5GAP/PSYCO106

[00274] A linhagem FMP' 1.5gapA foi transformada com o plasmídeo pSYCO106. A produção de glicerol foi determinada em fermentadores de 14 litros, conforme descrito em Métodos Gerais, com as diferenças a seguir em parâmetros de controle para fermentação. Um frasco congelado descongelado de FMP' 1.5gap/pSYCO106 foi transferido para 500 ml de SBG a 1% com 50 mg/l de espectinomicina para preparar a cultura

prévia. Nenhuma vitamina B₁₂ foi adicionada ao fermentador. Uma fermentação típica resultou na produção de 202 g/l de glicerol com rendimento molar de 115%.

EXEMPLO 17B

PRODUÇÃO DE GLICEROL COM LINHAGEM TT/PSYCO109

[00275] A produção de glicerol foi determinada em fermentadores de 14 litros, conforme descrito em Métodos Gerais, com as diferenças a seguir em parâmetros de controle para fermentação. Uma única colônia de TT/pSYCO109 em uma placa LB com 50 mg/l de espectinomicina foi transferida para 30 ml de LB com 100 mg/l de espectinomicina em um frasco de 250 ml. Ao atingir-se um OD₅₅₀ de cerca de 1 Au, 10,8 ml da cultura foram utilizados para inocular um fermentador preparado conforme descrito. Não se adicionou vitamina B₁₂ ao fermentador. Uma fermentação típica resultou na produção de 302 g/l de glicerol com rendimento molar de 137%.

REIVINDICAÇÕES

1. *ESCHERICHIA COLI* TRANSGÊNICA, capaz de produzir 1,3-propanodiol a partir de um substrato de carbono, caracterizada por compreender:

a) um sistema de fosfoenolpiruvato-glicose fosfotransferase endógeno interrompido que evita a expressão de proteínas do sistema de PEP-glicose fosfotransferase ativa, em que o sistema de fosfoenolpiruvato-glicose fosfotransferase endógeno interrompido compreende:

a1) um gene *ptsH* endógeno interrompido que evita a expressão de proteína fosfotransportadora ativa;

a2) um gene *ptsI* endógeno interrompido que evita a expressão de fosfoenolpiruvato-proteína fosfotransferase ativa; e

a3) um gene *crr* endógeno interrompido que evita a expressão de componente IIA específico de glicose ativo;

b) um gene *galP* endógeno suprarregulado que codifica um cotransportador de prótons-galactose ativo;

c) um gene *glK* endógeno suprarregulado que codifica glicoquinase ativa;

d) um gene *gapA* endógeno infrarregulado que codifica gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase ativa; e, adicionalmente:

e) glicerol-3-fosfato desidrogenase;

f) glicerol-3-fosfatase;

g) desidratase; e

h) fator de reativação de desidratase.

2. *ESCHERICHIA COLI* TRANSGÊNICA, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por compreender adicionalmente um ou mais dentre:

e) um gene *arcA* endógeno interrompido que evita a expressão de proteína de controle da respiração aeróbica ativa;

f) um gene *ppc* endógeno suprarregulado que codifica fosfoenolpiruvato carboxilase ativo;

g) um gene *btuR* endógeno suprarregulado que codifica cob(I)alamina adenosiltransferase ativa; e

h) um gene *yqhD* suprarregulado que codifica álcool desidrogenase ativa.

3. *ESCHERICHIA COLI* TRANSGÊNICA, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 2, caracterizada por compreender adicionalmente um ou mais dentre:

i) um gene *mgsA* endógeno interrompido que evita a expressão de metilglioal sintase ativa;

j) um gene *ackA* endógeno interrompido que evita a expressão de acetato quinase ativa;

k) um gene *pta* endógeno interrompido que evita a expressão de fosfotrasacetilase ativa;

l) um gene *aldA* endógeno interrompido que evita a expressão de aldeído desidrogenase A ativa; e

m) um gene *aldB* endógeno interrompido que evita a expressão de aldeído desidrogenase B ativa.

4. *ESCHERICHIA COLI* TRANSGÊNICA, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada por compreender adicionalmente um ou mais dentre:

n) um gene *edd* endógeno interrompido que evita a expressão de fosfogliconato desidratase ativa;

o) um gene *glpK* endógeno interrompido que evita a expressão de glicerol quinase ativa; e

p) um gene *gldA* endógeno interrompido que evita a expressão de glicerol desidrogenase dependente de NADH ativa.

5. *ESCHERICHIA COLI* TRANSGÊNICA, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por compreender adicionalmente:

e) um gene *arcA* endógeno interrompido que evita a expressão de proteína de controle da respiração aeróbica ativa;

f) um gene *ppc* endógeno suprarregulado que codifica fosfoenolpiruvato carboxilase ativo;

g) um gene *btuR* endógeno suprarregulado que codifica cob(I)alamina adenosiltransferase ativa;

h) um gene *yqhD* suprarregulado que codifica álcool desidrogenase ativa;

i) um gene *mgsA* endógeno interrompido que evita a expressão de metilglioal sintase ativa;

j) um gene *ackA* endógeno interrompido que evita a expressão de acetato quinase ativa;

k) um gene *pta* endógeno interrompido que evita a expressão de fosfotrasacetilase ativa;

l) um gene *aldA* endógeno interrompido que evita a expressão de aldeído desidrogenase A ativa;

m) um gene *aldB* endógeno interrompido que evita a expressão de aldeído desidrogenase B ativa;

n) um gene *edd* endógeno interrompido que evita a expressão de fosfogliconato desidratase ativa;

o) um gene *glpK* endógeno interrompido que evita a expressão de glicerol quinase ativa;

p) um gene *gldA* endógeno interrompido que evita a expressão de glicerol desidrogenase dependente de NADH ativa; e

q) qualquer das seqüências de nucleotídeos para uma construção pSYCO de SEQ ID N° 65, 66, 67 ou 68.

6. MÉTODO PARA A BIOPRODUÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL, caracterizado por compreender o contato da *Escherichia coli* transgênica, conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 5 com um substrato de carbono apropriado, sob condições adequadas.

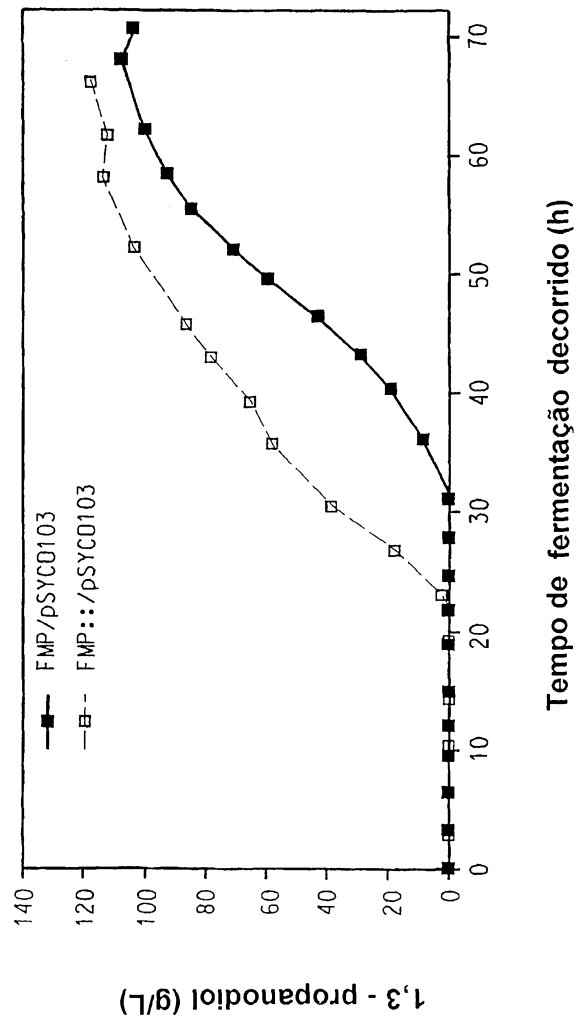


Fig. 1