República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) **PI 0014662-5 B1**

(22) Data do Depósito: 22/09/2000

(45) Data de Concessão: 01/03/2016

(RPI 2356)

(54) Título: MÉTODO DE CONVERTER GLICEROL A 1,3-PROPANODIOL EM CALARAMATOR VITERBIENSIS

(51) Int.Cl.: C12P 7/04; G01N 33/554; G01N 33/569; C08G 63/78; C08G 63/87

(30) Prioridade Unionista: 24/09/1999 US 09/405,692

(73) Titular(es): DANISCO US INC.. THE UNIVERSITY OF GEORGIA RESEARCH FOUNDATION, INC.

(72) Inventor(es): MARKUS SEYFRIED

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"MÉTODO DE CONVERTER GLICEROL A 1,3-PROPANODIOL EM *CALORAMATOR VITERBIENSIS*".**

1. CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a novos métodos e reagentes aperfeiçoados para a produção de 1,3-propanodiol. Em particular, a presente invenção fornece novos organismos termofílicos e enzimas termoestáveis capazes de catalisar a fermentação de glicerol a 1,3-propanodiol. A presente invenção também refere-se a métodos de isolar tais organismos termofílicos, métodos de clonar polinucleotídeos que codificam tais enzimas, polinucleotídeos codificando tais enzimas, e métodos de usar tais enzimas e organismos para a produção de 1,3-propanodiol.

2. FUNDAMENTOS

1,3-Propanodiol é um monômero usado na produção de fibras de poliéster e a fabricação de poliuretanos e compostos cíclicos.

Uma variedade de rotas sintéticas para 1,3-propanopdiol é conhecida. Por exemplo 1,3-propanopdiol pode ser sintetizado: (1) pela conversão de óxido de etileno sobre um catalisador na presença de fosfina, água, monóxido de carbono, hidrogênio e um ácido; (2) pela hidratação de fase de solução catalítica de acroleína, seguido por redução; ou (3) reagindo um hidrocarboneto (por exemplo, glicerol) na presença de monóxido de carbono e hidrogênio sobre catalisadores tendo átomos do grupo VIII da tabela periódica. Entretanto, métodos de síntese química tradicionais são caros e geram fluxos residuais contendo poluentes ambientais, e estão assim longe do ideal. Seria desejável desenvolver métodos e reagentes alternativos para a produção de 1,3-propanopdiol que são menos caros e mais amigavelmente ambientais.

Uma aproximação alternativa é usar enzimas, ou *in vivo* (isto é, em um microorganismo) ou *in vitro*, para catalisar a fermentação de glicerol a 1,3-propanopdiol. Veja, por exemplo, WO 98/21339, WO 98/21341, e Patentes U.S. Nºs. 5.821.092, 5.254.467., 5.632. 362 e 5.686.276. Classes bacterianas aptas a produzir 1,3-propanodiol proveniente de glicerol têm sido descobertas, por exemplo, nos grupos *Citrobacter, Clostridium, Enterobac-*

ter, Ilyobacter, Klebsiella, Lactobacillus, e *Pelobacter.* Estas bactérias convertem glicerol a 1,3-propanopdiol por meios e uma reação catalisada por enzimas de duas etapas. Na primeira etapa, uma desidratase catalisa a conversão de glicerol a 3-hidroxi-proprionaldeído (3-HP) e água (Equação 1). Na segunda etapa, 3-HP é reduzida a 1,3-propanopdiol por uma oxireductase ligada a NAD^+ (Equação 2).

Glicerol – 3-HP + H_2O (Equação 1)

3-HP + NADH + H^+ - 1,3-propanopdiol + NAD^+ (Equação 2)

O 1,3-propanopdiol não é metabolizado além disso, e como um resultado, pode acumular no meio a uma concentração alta. A reação total resulta na oxidação de dinucleotídeo de adenina de b-nicotinamida reduzido (NADH) a dinucleotídeo de adenina de nicotinamida (NAD^+).

A biconversão de glicerol a 1,3-propanopdiol é geralmente executado sob condições anaeróbias usando glicerol como a única fonte de carbono e na ausência de outros receptores equivalentes redutores exógenos. Em algumas classes bacteriais, por exemplo, certas classes de *Citrobacter, Clostridium*, e *Klebsiella*, um caminho paralelo para metabolismo de glicerol opera o qual primeiro envolve oxidação de glicerol a dihidroxiacetona (DHA) por uma desidrogenase de glicerol ligado a NAD^+ - (ou $NADP^+$) (Equação 3). O DHA, seguindo fosforilação a fosfato de dihidroxiacetona (DHAP) por uma DHA quinase (Equação 4), torna-se disponível para biosíntese e para fornecer geração de ATP via, por exemplo, glicólise.

Glicerol + NAD^+ - DHA + NADH + H^+ (Equação 3)

DHA + ATP – DHAP + ADP (Equação 4)

Em contraste ao caminho de 1,3-propanopdiol, este caminho pode fornecer carbono e energia para a célula e produz em vez de consumir NADH.

Em *Klebsiella penumoniae* e *Citrobacter freundii*, os genes codificando as atividades funcionalmente ligadas de desidratase de glicerol (*dhaBCE*), 1,3-propanopdiol oxireductase (*dhaI*), glicerol desidrogenase (*dhaD*), e dihidroxiacetona quinase (*dhaK*) são encontrados no *dha* regulon. Os *dha* regulons provenientes de *Citrobacter* e *Klebsiella* têm sido expressos

em *Escherichia coli* e têm sido apresentados a converter glicerol a 1,3-propanopdiol (Tong e outros, *Appl. Environ. Microbiol.* 57:3541-46 (1991); Seyfried e outros, *J. of Bact.* 178:5793-96 (1996); Tobimatsu e outros, *J. Biol. Chem.* **271**:22352-22357 (1996)).

Em vista das vantagens potenciais inerentes no uso de métodos e reagentes biológicos para produzir 1,3-propanopdiol, existe uma necessidade para o desenvolvimento e identificação de novos microorganismos e enzimas capazes de converter glicerol e outros substratos de carbono a 1,3-propanopdiol tendo características superiores. A presente invenção satisfaz aquela necessidade fornecendo microorganismos e enzimas superiores, junto com métodos de identificar outros microorganismos e enzimas superiores.

3. SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a métodos e reagentes aperfeiçoados para a produção de 1,3-propanodiol. Em particular, a presente invenção fornece novos organismos termofílicos e enzimas termoestáveis capazes de catalisar a fermentação de glicerol a 1,3-propanodiol. A presente invenção também refere-se a métodos de isolar tais organismos termofílicos, métodos de clonar polinucleotídeos que codificam tais enzimas, polinucleotídeos codificando tais enzimas, e métodos de usar tais enzimas e organismos para a produção de 1,3-propanodiol.

Em um aspecto, a invenção fornece um método de converter glicerol a 1,3-propanodiol em um organismo termofílico, o método compreendendo: fornecendo um organismo termofílico que fermenta glicerol a 1,3-propanodiol; e cultivando o organismo termofílico sob condições tais que 1,3-propanodiol seja produzido. Em uma concretização preferida, o método adicional compreende a etapa de coletar 1,3-propanodiol produzido pelo organismo termofílico. Em outra concretização preferida, o organismo termofílico é *Caloramator viterbiensis*, onde um organismo termofílico derivado do organismo depositado como designação de ATCC PTA-584 é particularmente preferido.

A invenção além disso fornece um método de produzir 1,3-

propanodiol proveniente de glicerol, o método compreendendo: incubando glicerol com uma enzima desidratase termoestável, desse modo convertendo o glicerol a 3-hidroxipropionaldeído; e reduzindo o 3-hidroxipropionaldeído a 1,3-propanodiol. Em uma concretização preferida, a redução do 3-hidroxipropionaldeído a 1,3-propanodiol é catalisado por uma 1,3-propanodiol oxireductase termoestável. Em outra concretização preferida, o método além disso compreende a etapa de coletar 1,3-propanodiol. Em ainda outra concretização preferida, a enzima desidratase termoestável é derivada de um organismo termofílico tal como *Caloramator viterbiensis*, onde um organismo derivado do organismo depositado como Designação de ATCC PTA-584 é particularmente preferido.

Ainda outro aspecto da invenção fornece uma enzima de fermentação de glicerol termoestável isolada que é derivada de *C. viterbiensis*, onde a enzima de fermentação de glicerol termoestável derivada do organismo depositado como Designação de ATCC PTA-584 é particularmente preferido. Em concretizações preferidas particulares, a enzima de fermentação de glicerol termoestável é uma desidratase, tal como desidratase de glicerol, ou uma oxireductase ligada a NAD^+, tal como 1,3-propanodiol oxireductase. A invenção também fornece uma enzima de fermentação de glicerol termoestável isolada que é homóloga a uma enzima de fermentação de glicerol termoestável derivada de *C. viterbiensis.*

Também fornecido prla invenção é uma cultura ou célula isolada de *C. viterbiensis*. Em uma concretização não limitante, o genoma da cultura ou célula é pelo menos 85% idêntico ao genoma dos organismos depositados como Designação de ATCC PTA-584, preferivelmente 90% idêntico ao genoma dos organismos depositados como Designação de ATCC PTA-584, mais preferivelmente 95% idêntico ao genoma dos organismos depositados como Designação de ATCC PTA-584, e mais preferivelmente pelo menos 99% idêntico ao genoma de organismos depositados como PTS-584 de designação de ATCC. Em outra concretização não limitante, a seqüência de 16S rDNA da cultura ou célula é pelo menos 95% idêntico a seqüência de 16S rDNA dos organismos depositados como Designação de ATCC PTA-

584, e preferivelmente pelo menos 98% idêntico a seqüência de 16S rDNA dos organismos depositados como Designação de ATCC PTA-584.

Em outro aspecto, a presente invenção fornece um método de clonar uma seqüência de polinucleotídeo que codifica uma enzima de fermentação de glicerol termoestável, o método compreendendo: hibridizando sondas de polinucleotídeo homólogas a uma porção de um gene de enzima de fermentação de glicerol conhecida a uma molécula de polinucleotídeo de uma amostra ambiental suspeita de conter um organismo termofílico; e isolando uma seqüência de polinucleotídeo que aglutina a pelo menos uma sonda de polinucleotídeo. Em uma concretização não limitante, o método usa uma reação de cadeia de polimerase para ampliar a seqüência de polinucleotídeo que aglutina a sondas de polinucleotídeos. Em uma concretização preferida, a enzima de fermentação de glicerol termoestável é derivada de um organismo termofílico identificado como fermentando glicerol a 1,3-propanodiol, onde *C. viterbiensis* é particularmente preferido. Em outra concretização preferida, as sondas de polinucleotídeos são homólogas a uma porção de um gene de dhaB conhecido, onde sondas homólogas ao gene de dhaB de *Klebsiella* são particularmente preferidas.

A invenção além disso fornece um método de clonar uma seqüência de polinucleotídeo que codifica uma enzima de fermentação de glicerol de termoestável, o método compreendendo: transformando um organismo alvo que não pode ser cultivado anaerobiamente em glicerol com DNA de uma organismo termofílico; e identificando aqueles organismos alvos transformados que contém a seqüência de polinucleotídeo que codifica uma enzima que fermenta glicerol a 1,3-propanodiol por seu crescimento anaeróbio em glicerol. Em uma concretização não limitante, a enzima de fermentação de glicerol termoestável a 1,3-propanodiol, tal como *C. viterbiensis*, onde um organismo termofílico derivado do organismo depositado como Designação de ATCC PTA-584 é particularmente preferido.

Ainda outro aspecto da invenção fornece um método de isolar um organismo termofílico que catalisa a fermentação de glicerol a 1,3-propanodiol, o método compreendendo: incubando uma amostra contendo

organismos termofílicos em meio contendo glicerol como a fonte de carbono primária; e isolando pelo menos um organismo termofílico que fermenta glicerol em 1,3-propanodiol. Em concretização não limitantes, a amostra é incubada em uma temperatura no limite de aproximadamente 40°C a aproximadamente 100°C e/ou sob condições anaeróbias. Em outra concretização não limitante, a mostra é obtida de uma fonte natural tendo uma temperatura de entre aproximadamente ambiente a cerca de 100°C, e mais preferivelmente de aproximadamente 50°C a cerca de 100°C. Em uma concretização preferida, o método além disso compreende a etapa de detectar produção de 1,3-propanodiol e/ou acetato pelo organismo termofílico.

4. BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1 mostra o efeito de temperatura em crescimento de classe JW/MS-VS-5, td = tempo de duplicação .

Figura 2 mostra o efeito de pH^{25C} em crescimento de classe JW/MS-VS-5 a 60°C, td = tempo de duplicação .

Figura 3 mostra uma dendrograma filogenético não enraizado em uma comparação das seqüências de gene de 16S rDNA de JW/MS-VS-5 e classes não relacionadas. A árvore de união adjacente foi reconstruída proveniente de matrizes de distâncias. Valores de comando de entrada das análises de 1000 séries de dados (expressos como porcentagens) são mostrados nos pontos de ramificação. A barra de escala representa 5 substituições de nucleotídeos por 100 nucleotídeos.

Figura 4 mostra um ensaio de rota de duração para a conversão de glicerol a 3-HPA por células de JW/MS-VS-5 anaerobiamente tolueniza-das a 60°C sob condições anaeróbias .

Figura 5 mostra um ensaio de rota de duração para a conversão de 1,2-propanodiol a propionaldeído por células de JW/MS-VS-5 anaerobiamente toluenizadas a 60°C sob condições anaeróbias .

5. DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Organismos termofílicos são organismos que podem sobreviver e crescer em temperaturas elevadas onde a maioria dos outros organismos (por exemplo, mesófilos) não estariam aptos a sobreviver. Esta resiliência

incomum com respeito a temperaturas altas resulta em parte destes usos dos organismos de enzimas termoestáveis para catalisar as reações biológicas da vida. Enzimas termoestáveis permitem organismos termofílicos catalisar reações metabólicas em temperaturas elevadas. Tais organismos podem ser isolados de ambientes a temperatura ambiente, mas não são provavelmente isolados de ambientes com temperaturas altas incluindo, por exemplo, fontes quentes, respiradouros térmicos e efluentes de lavanderias. A termoestabilidade incomum de bactérias e enzimas termofílicas permite um catalisar bioconversões economicamente valiosas em temperaturas mais altas do que poderiam ser alcançadas usando organismos e enzimas mesofílicos. Em muitos casos, bactérias termofílicas são usadas para catalisar a reação desejada *in vivo* em um processo de fermentação. Alternativamente, enzimas termoestáveis podem ser usadas para catalisar *in vivo* ou bioconversões "livres de células", tipicamente por meios de enzimas que tenham sido imobilizadas, para facilitar controle da reação e recuperação do produto da reação.

Várias vantagens podem ser alcançadas executando bioconversões em temperaturas elevadas. Como é o caso com qualquer reação químicas, as taxas de reações enzimaticamente catalisadas geralmente aumentam dramaticamente com um aumento na temperatura da reação. Benefícios de eficiência óbvios são derivados proveniente de aumentar a taxa na qual uma bioconversão industrial procede. Além disso, é possível prevenir contaminação microbial de um meio de reação conduzindo a reação em uma temperatura elevada onde a maioria dos organismos contaminantes potenciais está inapta a sobreviver.

Outra vantagem de usar um organismo termofílico para catalisar uma bioconversão em temperaturas altas é aquela em alguns casos a temperatura alta facilita a separação e isolamento do produto desejado do meio de reação. Por exemplo, No. de Patente U.S. 5.182.199 descreve o uso de enzimas termoestáveis e fermentação em temperatura alta para facilitar a separação de etanol de um meio de reação.

Além de ser estável com respeito a temperaturas elevadas, en-

zimas termoestáveis são também geralmente encontradas a possuírem estabilidade acentuada com respeito a outras condições e substâncias que normalmente inativam enzimas. Enzimas termoestáveis também tendem a ter uma vida de armazenagem maio do que enzimas derivadas de um organismo mesofílico. A presente invenção fornece métodos e reagentes aperfeiçoados para a produção catalisada por enzima de 1,3-propanodiol. Em parte, a presente invenção fornece, pela primeira vez, organismos termofílicos e enzimas termoestáveis capazes de catalisar a fermentação de glicerol em 1,3-propanodiol. Uma nova característica destes organismos e enzimas é sua capacidade para permanecer viável e cataliticamente ativa em temperaturas elevas, temperaturas nas quais organismos e enzimas produzindo 1,3-propanodiol previamente identificadas são rapidamente desativadas. Os métodos e composições da invenção podem ser usados para biologicamente glicerol a 1,3-propanodiol em temperaturas elevadas, desse modo fornecendo vantagens significantes sobre métodos previamente descritos, particularmente métodos conduzidos em temperaturas inferiores. A presente invenção além disso inclui métodos de identificar organismos termofílicos capazes de produzir 1,3-propanodiol proveniente de glicerol, bem como métodos de clonar polinucleotídeos que codificam enzimas termoestáveis que catalisam esta conversão.

5.1. Organismos Termofílicos Capazes de Fermentar Glicerol a 1,3-Propanodiol em Temperaturas Elevadas, e Métodos de Isolar Tais Organismos

Em uma concretização preferida, a instante invenção fornece um organismo termofílico capaz de fermentar glicerol a 1,3-propanodiol em temperaturas elevadas.

Como usado aqui contido, o termo "organismo termofílico" refere-se a um organismo capaz de cultivar em uma temperatura alta, preferivelmente em temperaturas maiores do que 50°C, mais preferivelmente em temperaturas maiores do que 60°C, ainda mais preferivelmente em temperaturas maiores do que 70°C, e mais preferivelmente em temperaturas maiores do que 85°C. Organismos que são capazes de crescer em temperaturas

maiores do que 85°C são chamados organismos hipertermofílicos. Exemplos de organismos termofílicos podem ser encontrados, por exemplo, entre os microorganismos procarióticos, eubactérias e archaebactérias. Tais organismos inabitam, e podem ser isolados de, ambientes quentes tais como fontes quentes, áreas vulcânicas, e respiradouros térmicos submarinos. Além disso, organismos termofílicos podem ser isolados de fontes em temperaturas ambientes.

Em uma concretização preferida da invenção, o organismo termofílico capaz de fermentar glicerol a 1,3-propanodiol em temperaturas elevadas é uma classe de *Caloramator viterbiensis*. *C. viterbiensis* é uma espécie de bactérias termofílicas capazes de fermentar glicerol a 1,3-propanodiol e acetato. *C. viterbiensis* é definido aqui contido como um espécie bacterial possuindo as características de identificação seguintes: a espécie é (1) termofílica; (2) capaz de fermentar glicerol a 1,3-propanodiol; e (3) divide "identidade de seqüência genômica substancial" com a classe de tipo JW/MS-VS-5^T, depositada como Designação de ATCC PTA-584.

Em uma concretização não limitante da invenção, um membro da espécie *C. viterbiensis* também dividirá as características de identificação seguintes da classe de tipo JW/MS-VS5^t. Células de JW/MS-VS5^T são bastões retos ou ligeiramente curvados, 0,4 a 0,6 µm em dimensão. Células ocorrem unicamente ou em classe de Gram positivo. O limite de temperatura para crescimento em pH 6,0 é 33-64°C, a ótima a 58°C. O limite de pH^{25C} para crescimento é de 5,0 a 7,6, com um ótimo a 6,0-6,5. Crescimento é observado com glicerol, glucose, frutose, manose, galactose, sacarose celobiose, lactose, amido, e extrato de levedura. A classe não apreciavelmente fermenta xilose, arabinose, acetato, lactato, formato, metanol, etanol, n-propanol, i-propanol, n-butanol, propionato, acetona, sucinato, etileno glicol, 1,2-propanodiol, fenol e benzoato. Nenhum crescimento apreciável ocorre sob condições autotróficas na presença de H_2:CO_2. Fermentação de glicerol rende acetato e 1,3-propanodiol como os produtos orgânicos primários, com quantidades significantes de H_2 produzido durante crescimento. Crescimento é inibido por ampicilina, cloranfenicol, etitromicina, rifampicina e canamicina

(tdoas a 100 µg/ml). Estreptomicina ou tetraciclina mesmo assim retarda crescimento. O conteúdo de G + C do DNA de classe é 32 % de mol, como determinado por HPLC.

Para os propósitos de identificar um membro putativo da espécie *C. viterbiensis*, o termo "identidade de seqüência genômica substancial" refere-se a ou: pelo menos 90% de identidade, preferivelmente pelo menos 95% de identidade, e mais preferivelmente pelo menos 99% de identidade da seqüência de genoma do organismo com seqüência de genoma de classe do tipo JW/MW-VS5^T, ou , pelo menos 90% de identidade, preferivelmente pelo menos 95% de identidade, e mais preferivelmente pelo menos 99% de identidade da seqüência de 16S rDNA do organismo com a seqüência de 16S rDNA de classe de tipo JW/MS-VS5^T.

Identidade de seqüência substancial pode ser determinada pela comparação das seqüências genômicas completas de uma *C. viterbiensis* putativa e JW/MS-VS5^T. Alternativamente, identidade de seqüência substancial pode ser determinada pela comparação das seqüências de 16S rDNA de uma *C. viterbiensis* putativa e JW/MS-VS5^T. A seqüência de toda ou uma porção do genoma de JW/MS-VS5^T e *C. viterbiensis* putativa, particularmente a seqüência de 16S rDNA do organismo, pode ser determinada por técnicas de sequenciamento de ácido nuclêico convencionais bem conhecidas àqueles peritos na técnica (veja, por exemplo, SAMBROOK E OUTROS, MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL (1989)) e CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (Ausubel e outros, eds. 1989)). As seqüências podem ser comparadas, usando métodos de comparação de seqüência bem conhecidos ao artífice perito. Por exemplo, porcentagem de identidade pode ser calculada usando o programa de computador de BLAST, versão 2,0, disponível na Rede Mundial em http://www.ncbi.nlm.nih.gov. Para uma descrição de BLAST, veja, por exemplo, Altschul e outros, *J. Mol. Biol.* 215:403-10 (1990) e Altschul e outros, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402 (1997).

Em uma concretização específica, a invenção fornece um microorganismo termofílico capaz de fermentar glicerol a 1,3-propanodiol, o ge-

noma do qual é hibridizável ao genoma da classe de tipo JW/MS-VS5^T sob condições de baixa severidade. Em uma concretização preferida alternativa, a invenção fornece um microorganismo termofílico capaz de fermentar glicerol a 1,3-propanodiol, a seqüência de 16S rDNA da qual é hibridizável a seqüência de 16S rDNA da classe de tipo JW/MS-VS5^T sob condições de baixa severidade. Procedimentos usando tais condições de baixa severidade podem ser como segue (veja também Shilo e Weinberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 6789-6792 (1981)): Filtros contendo DNA são pré-tratados por 6 h a 40°C em uma solução contendo 35% de formamida, 5X SSC, 50 mM de Tris-HCl (pH 7,5), 5 mM EDTA, PVP 0,1%, Ficoll 0,1%, BSA 1%, e 500 µg/ml de DNA de esperma de salmão desnaturado. Hibridizações são realizadas na mesma solução com as modificações seguintes: PVP 0,2%, Ficoll 0,02%, BSA 0,2%, 100 µg/ml de DNA de esperma de salmão, sulfato de dextrano 10% (p/vol), e 5-20 X 10^6 cpm de sonda rotulada por ^{32}P é usada. Filtros são incubados em mistura de hibridização por 18-20 h a 40°C, e então lavados por 1,5 h a 55°C em uma solução contendo 2 X SSC, 25 mM de Tris-HCl (pH7,4), 5 mM de EDTA, e SDS 0,1%. A solução de lavagem é substituída com solução fresca e incubada uma adicional de 1,5 h a 60°C. Filtros são manchados secos e expostos a autoradiografia. Se necessário, filtros são lavados por uma terceira vez a 65-68°C e reexpostos a película. Outras condições de baixa severidade as quais podem usadas são bem conhecidas na técnica (por exemplo, como empregado para hibridizações de espécies cruzadas).

Em outra concretização específica, a invenção fornece um microorganismo termofílico capaz de fermentar glicerol a 1,3-propanodiol, o genoma do qual é hibridizável ao genoma da classe de tipo JW/MS-VS5^T sob condições de severidade moderada. Em uma concretização preferida, a invenção fornece um microorganismo termofílico capaz de fermentar glicerol a 1,3-propanodiol, a seqüência de 16S rDNA da qual é hibridizável a seqüência de 16S rDNA da classe de tipo JW/MS-VS5^T sob condições de severidade moderada. Procedimentos usando tais condições de severidade moderada podem ser como segue: Filtros contendo DNA são pré-tratados

por 6 h a 55°C em uma solução contendo 6X SSC, 5X solução de Denhart, SDS 0,5% e 100 µg/ml de DNA de esperma de salmão desnaturado. Hibridizações são realizadas na mesma solução e 5-20 X 10^6 cpm de sonda rotulada por ^{32}P é usada. Filtros são incubados em mistura de hibridização por 18-20 h a 55°C, e então lavados duas vezes por 30 minutos a 60°C em uma solução contendo 1 X SSC e SDS 0,1%. Filtros são manchados secos e expostos a autoradiografia. Outras condições de severidade moderada as quais podem ser usadas são bem conhecidas na técnica. Lavagem dos filtros é feita a 37°C por 1 h em uma solução contendo 2 X SCC, SDS 0,1%.

Em outra concretização específica, a invenção fornece um microorganismo termofílico capaz de fermentar glicerol a 1,3-propanodiol, o genoma do qual é hibridizável ao genoma da classe de tipo JW/MS-VS5^T sob condições de alta severidade. Em uma concretização preferida alternativa, a invenção fornece um microorganismo termofílico capaz de fermentar glicerol a 1,3-propanodiol, a seqüência de 16S rDNA da qual é hibridizável a seqüência de 16S rDNA da classe de tipo JW/MS-VS5^T sob condições de alta severidade. Procedimentos usando tais condições de baixa severidade podem ser como segue: Prehibridização de filtros contendo DNA é realizada por 8 h a noite inteira a 65°C em compensador composto de 6X SSC, 50 mM de Tris-HCl (pH 7,5), 5 mM EDTA, PVP 0,02%, Ficoll 0,02%, BSA 0,02%, e 500 µg/ml de DNA de esperma de salmão desnaturado. Filtros são hibridizados por 48h a 65°C em uma mistura de prehibridização contendo 100 µg/ml de DNA de esperma de salmão e 5-20 X 10^6 cpm de sonda rotulada por ^{32}P. Lavagens de filtros é feita a 37°C por 1 h em uma solução contendo 2 X SSC, PVP 0,1%, Ficoll 0,01%, e BSA 0,01%. Isto é seguido por uma lavagem em 0,1X SSC a 50°C por 45 min antes de autoradiografia. Outras condições de alta seriedade as quais podem ser usadas são bem conhecidas na técnica.

A espécie *C. viterbiensis* além disso inclui a prole da classe de tipo JW/MS-VS5^T. Fenótipos e/ou genótipos podem ser alterados por mutação, incluindo como o resultado de mutagênese direcionada ou aleatória. A invenção fornece células tendo mutações únicas ou múltiplas especifica-

mente designadas a acentuar a produção de 1,3-propanodiol. Por exemplo, é contemplado que uma classe de mutante capaz de fermentar glicerol a 1,3-propanodiol em um modo que é resistente a repressão do substrato ou produto seria particularmente útil na presente invenção.

Métodos de criar mutantes são comuns e bem conhecidos na técnica. Por exemplo, células do tipo selvagem podem ser expostas a uma variedade de agentes, tais como radiação ou mutagênese química, e então peneiradas para o fenótipo desejado. Quando criando mutações através da radiação, ou radiação ultravioleta (UV) ou ionizante podem ser usadas. Métodos específicos para criar mutantes usando radiação ou agentes químicos são bem documentados na técnica. *Veja, por exemplo,* Brock, *Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology,* Segunda Edição (1989) Sinauer Associatesm Inc., Sunderland, Mass., ou Deshpande, *Appl. Biochem. Biotechnol.,* 36:227-34 (1992), incorporadas aqui contido por referência. Seguindo tratamento mutagênico, mutantes tendo o fenótipo desejado podem ser selecionados por uma variedade de métodos. Peneiramento aleatório é mais comum onde as células mutagenizadas são selecionadas para o atributo desejado. Métodos de seleção mutante são altamente desenvolvidos e bem conhecidos na técnica de microbiologia industrial. *Veja, por exemplo,* Brock, *supra.*

A instante invenção além disso fornece métodos de isolar e manter em organismos termofílicos de cultura capazes de fermentar glicerol a 1,3-propanodiol. Tais organismos são úteis em pratica concretizações desta invenção, por exemplo, eles podem ser usados para biologicamente converter glicerol a 1,3-propanodiol em uma temperatura elevada, ou eles podem ser usados como uma fonte de enzima termoestável que fermenta glicerol, ou um polinucleotídeo codificando o mesmo.

Materiais e métodos adequados para a manutenção de crescimento de culturas bacteriais podem ser encontrados, por exemplo, em MANUAL OF METHODS FOR GENERAL BACTERIOLOGY (Gerhardt e outros, eds), American Society for Microbiology, Washington, D.C. ou Brock *supra.* Reagentes e materiais usados para o crescimento e manutenção de células

bacteriais podem ser obtidos de fornecedores comerciais por exemplo, Aldrich Chemicals (Milwaukee, Wis.). DIFCO Laboratories (Detroit, Mich), Gibco/BRL (Gaitherburg. Md.), ou Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo.).

Um organismo termofílico da invenção, por exemplo, *C. viterbiensis*, pode ser isolado de qualquer ambiente que é condutor a crescimento de organismo termofílicos, por exemplo, um respiradouro térmico, fonte natural ou solo quente e água e sedimentos em torno deles. , ou efluente de lavanderia. Uma amostra consistindo de, por exemplo, sedimento, água ou uma mistura disso, coletado do ambiente de interesse. É desejável determinar o pH e temperatura no ponto de amostragem como uma indicação de condições ótimas para crescimento de qualquer organismo isolado da amostra. A amostra é então usada inócua a uma meio de crescimento basal, preferivelmente um meio onde glicerol é a fonte de carbono única ou primária. Tipicamente, o meio basal é inoculado com a amostra a uma concentração final de aproximadamente 10% (p/v). O pH do meio deveria preferivelmente aproximar aquele do ponto de amostragem. Alternativamente, uma pluralidade de meios de crescimento basais em pH diferente pode ser inoculado para selecionar organismos tendo dependência de crescimento de pH diferente. A cultura enriquecida é então incubada em uma temperatura alta, preferivelmente pelo menos aproximadamente 50°C, mais preferivelmente pelo menos aproximadamente 60°C, e mais preferivelmente pelo menos aproximadamente 75°C, e é preferivelmente realizada em um ambiente anaeróbio ou microaeróbio. Guia para cultivar organismos termofílicos pode ser encontrado em, por exemplo, Weigel, J., "Methods for Isolation and Study of Thermophiles", Capítulo 4 em THERMOPHILES: GENERAL, MOLECULAR AND APPLIED MICROBIOLOGY, T. D. Brock, ed (John Wiley & Sons. N. Y.), pp. 17-37.

Quando uma cultura enriquecida é encontrada a ser apta para utilizar glicerol como uma fonte de carbono, uma cultura homogênea pode ser usolada preparando uma série de diluição da cultura, blindando a série em um meio basal sólido (por exemplo, agar 1,5%) usando revestimentos de

agar suaves (por exemplo, meio basal contendo agar 0,8%), colhendo e subcultivando colônias únicas em meio líquido da mesma composição, e verificando a formação de 1,3-propanodiol e/ou acetato. 1,3-Popanodiol pode ser identificado diretamente submentendo o meio a análise de cromatografia líquida de pressão alta (HPLC). Por exemplo, o meio de fermentação pode ser analisado em uma coluna de troca de íon analítica usando uma fase móvel de ácido sulfúrico 0,01N em uma modelo isocrático. Alternativamente, 1,3-propanodiol pode ser identificado usando outras técnicas analíticas apropriadas, incluindo, mas não limitado a, cromatografia gasosa (GC) e cromatografia gasosa-espectroscopia de massa (GC-MS).

Uma classe de um organismo termofílico encontrada capaz de converter glicerol a 1,3-propanodiol pode ser mantida em cultura usando técnicas de manutenção e preservação de cultura conhecidas na técnica. Estes métodos incluem refrigeração por períodos de tempo curtos, congelamento em nitrogênio líquido para armazenagem prolongada, e liofilização para desidratar as células. A escolha do método de preservação depende da natureza da cultura e as facilidades que estão disponíveis. Quando congelamento é usado, as taxas de congelamento e descongelamento devem ser cuidadosamente controladas para assegurar a sobrevivência dos microorganismos, já que cristais de gelo formados durante congelamento pode romper membranas. Glicerol é frequentemente empregado como uma agente de "anticongelamento" para prevenir dano devido a cristais de gelo e para assegurar a capacidade para recuperar microorganismos viáveis quando culturas congeladas são descongeladas.

5.2. Enzimas Termoestáveis Capazes de Produzir 1,3-Propanodiol em Temperaturas Elevadas

Em uma concretização, a instante invenção fornece uma enzima termoestável que catalisa uma etapa na fermentação de glicerol a 1,3-propanodiol em temperaturas elevadas, referida a aqui contido como uma "enzima de fermentação de glicerol termoestável".

Como usado aqui contido, o termo "enzima de fermentação de glicerol termoestável" refere-se a uma enzima a qual catalisa pelo menos

uma etapa de reação na fermentação de um glicerol a 1,3-propanodiol e a qual é "termoestável", isto é, estável e ativa a altas temperaturas, preferivelmente em temperaturas maiores do que 50°C, mais preferivelmente em temperaturas maiores do que 60°C, ainda mais preferivelmente em temperaturas maiores do que 70°C, e mais preferivelmente em temperaturas maiores do que 85°C. Uma enzima é "estável" em uma dada temperatura se ele está apta a reter pelo menos 50% de sua atividade catalítica original após exposição aquela temperatura por pelo menos 5 minutos, preferivelmente pelo menos 30 minutos, mais preferivelmente pelo menos uma hora, ainda mais preferivelmente por pelo menos 8 horas, e mais preferivelmente por pelo menos 24 horas ou mais. Em muitas instâncias, enzimas termoestáveis também têm vida de armazenagem aumentada e são mais estáveis a condições desnaturantes, tais como agitação física ou exposição a solventes orgânicos, do que enzimas não termoestáveis dividindo características funcionais similares.

Em uma concretização preferida, a invenção fornece uma enzima de fermentação de glicerol termoestável que é derivada de *C. viterbiensis*. Em uma concretização preferida, mas não limitante, a invenção fornece uma deshidratase termoestável derivada de *C. viterbiensis*. Em uma outra concretização preferida mas não limitante, a invenção fornece uma 1,3-propanodiol oxireductase termoestável derivada de *C. viterbiensis*. Em uma concretização particularmente preferida da invenção, a enzima de fermentação glicerol termoestável é derivada de classe de JW/MS-VS5^T.

Como usado aqui contido, o termo "desidratase" refere-se a qualquer enzima que seja capaz de catalisar a conversão de uma molécula de glicerol ao produto 3-hidroxipropionaldeído. Exemplos específicos de desidratases são glicerol desidratase e diol desidratase, isto é, desidratases tendo substratos preferidos de glicerol e 1,2-propanodiol, respectivamente.

O termo "1,3-propanodiol oxireductase" refere-se a umas enzimas capazes de catalisar a conversão 30hidroxipropionaldeído a 1,3-propanodiol com a oxidação concomitante de NADH.

A capacidade para catalisar a etapa de reação na fermentação

de um glicerol a 1,3-propanodiol pode ser determinada analisando a atividade da enzima. Atividade de fermentação de glicerol pode ser analisada usando técnicas conhecidas aqueles peritos na técnica. Por exemplo, métodos de analisar para a atividade de uma desidratase são descritos por Poppe e outros, *Eur. J. of Biochem* 245:398-41 (1997), Honda e outros, *J. of Bact.* 143:1458-65 (1980), e Macis e outros, *FEMS Microbiology Letters* 164:21-28 (1998), incorporado aqui contido por referência em sua integridade. Um método de análise para atividade de 1,3-propanodiol oxireductase é descrito, por exemplo, em Johnson e outros, *J. of Bact.* 169:2050-54 (1987), incorporado aqui contido por referência em sua integridade. Atividade de enzima pode ser determinada *in situ* usando células tratada com tolueno, como descrito por exemplo, por Honda e outros. A capacidade da enzima catalisar uma etapa de reação na fermentação de um glicerol a 1,3-propanodiol pode também ser determinada expressando a enzima em uma célula hospedeira que não é normalmente capaz de fermentar glicerol, e analisando se expressão da enzima permite a célula fermentar glicerol.

Para os propósitos desta invenção, a enzima produtora de 1,3-propanodiol termoestável é "derivada" de *C. viterbiensis*, ou uma classe especificada de *C. viterbiensis*, se: (a) ela é endogenamente expressa por *C. viterbiensis*, ou sua seqüência de amino ácido é codificada por uma seqüência de codificação de nucleotídeo que ocorre em *C. viterbiensis*; e (b) ela é útil em praticar a invenção. Como usado aqui contido, uma enzima é "útil em praticar a invenção" se ela é uma enzima de fermentação de glicerol termoestável, isto é, uma enzima que catalisa pelo menos uma etapa de reação na fermentação de um glicerol a 1,3-propanodiol e a qual é estável e ativa em temperaturas altas, preferivelmente em temperaturas maiores do que 50°C, mais preferivelmente em temperaturas maiores do que 60°C, ainda mais preferivelmente em temperaturas maiores do que 70°C, e mais preferivelmente em temperaturas maiores do que 85°C.

A invenção além disso fornece uma enzima que é homóloga a uma enzima de fermentação de glicerol termoestável derivada de *C. viterbiensis*. Para os propósitos desta invenção, uma enzima é "homóloga" a uma

enzima de fermentação de glicerol termoestável derivada de *C. viterbiensis* se: (a) sua seqüência de amino ácido é codificada por uma seqüência de codificação de polinucleotídeo que hibridiza ao complemento de uma seqüência de polinucleotídeo que codifica uma enzima de fermentação de glicerol termoestável derivada de *C. viterbiensis* sob condições moderadamente severas, isto é, hibridização a DNA ligado a filtro em 0,5 M de $NaHPO_4$, dodecil sulfato de sódio 7% (SDS), EDTA 1mM a 65°C, e lavagem em 0,2 X SSC/SDS 0,1% a 42°C (Ausubel e outros, 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. I, Green Publishing Associates, Inc, e John Wiley & sons, Inc, Nova Iorque, em p. 2.10.3); e (b) ela é útil em praticar a invenção. Em uma concretização preferida, a enzima homóloga é codificada por uma seqüência de codificação de nucleotídeo que hibridiza ao complemento de uma seqüência de polinucleotídeo que codifica a enzima de fermentação de glicerol termoestável derivada de *C. viterbiensis* sob condições altamente severas, isto é, hibridização a DNA ligado a filtro em $NaHPO_4$ 0,5 M, dodecil sulfato de sódio 7% (SDS), EDTA 1mM a 65°C, e lavagem em 0,1 x SSC/SDS 1% a 68°C (Ausubel e outros, 1989, supra) e é útil em praticar a invenção.

Uma enzima que é homóloga a uma enzima de fermentação de glicerol termoestável derivada de *C. viterbiensis* pode assumir várias formas. Em algumas concretizações da invenção a enzima homóloga é uma forma mutante de uma enzima de fermentação de glicerol termoestável derivada de *C. viterbiensis*, onde um ou mais resíduos de amino ácidos têm sido substituídos com um resíduo de amino ácido diferente, resultando em uma enzima útil em praticar a invenção. Mutações podem ser conservadoras, onde um resíduo de amino ácido é substituído com outro com outro resíduo de amino ácido dividindo características funcionais e estruturais similares, tais como acidez, polaridade, ou volume de cadeias laterais. Mutações podem também ser não conservadoras, onde as propriedades funcionais e/ou estruturais do resíduo de amino ácido substituído não são conservadas. Em alguns casos, uma forma mutante de uma enzima de fermentação de glicerol termoestável derivada de *C. viterbiensis* possuirá propriedades funcionais

alteradas relativo as enzimas nativas, tais como capacidade catalítica alterada, estabilidade, ou pH ou temperatura ótimos. Tais mutantes incluem-se no objetivo da invenção já que eles são homólogos a uma enzima de fermentação de glicerol termoestável derivada de *C. viterbiensis*.

Formas mutantes da enzima podem ser geradas por uma variedade de técnicas bem conhecidas aqueles peritos na técnica. Várias destas técnicas são revistas em No. de Patente U.S. 5.830.696, incorporadas aqui contido por referência em sua integridade, a qual descreve a evolução direcionada das enzimas termoestáveis. Alternativamente, enzimas mutantes podem ser aleatoriamente modificadas, ou ocorrem espontaneamente em um organismo.

Além do mais, a enzima que é homóloga a enzima de fermentação de glicerol termoestável derivada de *C. viterbiensis* pode ser um mutante de anulação ou variante truncada de uma enzima de *C. viterbiensis* nativa. O uso de tais formas de enzimas pode em alguns casos ser desejável, por exemplo, onde uma anulação ou truncamento resulta em estabilidade acentuada ou facilidade de purificação relativa a enzima nativa correspondente.

A invenção além disso fornece uma enzima que é homóloga a uma enzima de fermentação de glicerol termoestável derivada de *C. viterbiensis* que é uma forma quimérica de uma enzima de fermentação de glicerol termoestável derivada de *C. viterbiensis*, isto é, uma fusão de proteína. Quimeras podem ser úteis, por exemplo, para fornecer a estabilidade da enzima ou facilitar purificação, por exemplo, pela inclusão de uma porção capaz de associar com uma troca de íon, quelato de metal, afinidade substrato ou matriz de imunoafinidade. Em uma concretização preferida, a invenção fornece uma enzima homóloga covalentemente ligada a um suporte sólido, tal como celulose.

Além do mais, a invenção fornece uma enzima que é homóloga a uma enzima de fermentação de glicerol termoestável derivada de *C. viterbiensis* e que é derivado de um microorganismo diferente, preferivelmente um microorganismo termofílico. Um exemplo de tal enzima é uma enzima de fermentação de glicerol termoestável "homóloga", a qual é definida como

uma enzima codificada por um gene de uma espécie diferente, onde o gene é reconhecido por aqueles de perícia na técnica como um homólogo de um gene de fermentação de glicerol de *C. viterbiensis* baseado em um grau de identidade de seqüência de nucleotídeo maior do que aproximadamente 80%. Identidade de seqüência pode ser determinada usando o programa BLAST, como descrito supra.

Em uma concretização, a invenção fornece uma enzima de fermentação de glicerol termoestável, onde o termo "isolado" indica que enzima é pelo menos parcialmente pura, isto é, fornecido em uma preparação onde a porcentagem por peso da enzima, relativo a outro material na preparação, é maior do que seria encontrado na natureza. Em uma concretização preferida, a invenção além disso fornece uma enzima de fermentação de glicerol termoestável que é pelo menos 90% pura por peso de proteínas contaminantes, e mais preferivelmente pelo menos 95% puro por peso de proteínas contaminantes.

Materiais e métodos úteis na preparação e isolamento das enzimas antes mencionadas são descritos *infra*. Em uma concretização, uma enzima da invenção pode ser isolada de um organismo termofílico, particularmente uma classe de *C. viterbiensis*, que expressa a enzima endogenamente. Alternativamente, uma enzima da invenção pode ser produzida recombinantemente introduzindo uma seqüência de polinucleotídeo codificando a enzima em uma célula hospedeira apropriada e expressando o produto de gene codificado. Uma enzima da invenção pode também ser produzida por meios de tradução *in vitro*, ou por técnicas de síntese química.

5.3. Métodos de Clonar um Polinucleotídeo Codificando uma Enzima Termoestável que Converte Glicerol a 1,3-Propanodiol

A instante invenção fornece umas seqüências de polinucleotídeos codificando uma enzima de fermentação de glicerol termoestável, ou um fragmento disso, e métodos para identificar, isolar, e clonar tais polinucleotídeos. Estes métodos envolvem fornecendo uma amostra contendo seqüências de codificação de polinucleotídeos derivadas de um organismo termofílico ou organismos termofílicos, e peneirando uma seqüência de poli-

nucleotídeo codificando uma enzima de fermentação de glicerol termoestável, ou um fragmento disso. A amostra pode assumir qualquer uma de uma variedade de formas, e ser preparada por uma variedade de técnicas diferentes conhecidas aqueles de perícia na técnica. Similarmente, peneiramento da amostra pode ser executadas usando qualquer uma das várias técnicas adequadas, alguns exemplos não limitantes dos quais são descritos *infra*.

Produção e manipulação das moléculas de polinucleotídeos e moléculas de oligonucleotídeos reveladas aqui contidos estão dentro da perícia na técnica e podem ser realizadas de acordo com técnicas recombinantes descritas, entre outros locais, em SAMBROOK E OUTROS, MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL (1989); CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (Ausubel e outros eds., 1989); PCR STRATEGIES (Innis e outros, eds., 1995); e PCR TECHNOLOGY (Erlich ed. 1992), todas as quais são incorporadas aqui contidas por referência.

Em algumas concretizações da invenção, a amostra é peneirada com uma sonda tendo uma seqüência de nucleotídeo acreditada a codificar uma enzima de fermentação de glicerol, ou uma sonda ou sondas representando uma porção disso, ou uma seqüência de nucleotídeo codificando tal enzima. Por exemplo, a seqüência de amino ácido de uma porção de uma enzima de fermentação de glicerol pode ser determinada, usando técnicas de sequenciamento de amino ácido descritas, por exemplo, em CREIGHTON, PROTEIN STRUCTURES AND MOLECULAR PRINCIPLES (1983), e a informação usada ara gerar uma série de sondas de degeneração. Em uma concretização preferida da invenção, uma amostra é peneirada usando uma sonda ou sondas baseadas em uma seqüência codificando uma desidratase ou oxidoreductase derivada de um organismo termofílico tal como *C. Viterbiensis*. Alternativamente, a sonda pode ser baseada em um gene de codificação de enzima de fermentação de glicerol derivado de um organismo não termofílico (por exemplo, *K. pasteuriamum, C. freundii,* ou *C. pasteurianum*), tal como os genes de dhaBCE e dhaT, os quais codificam glicerol desidratase e oxidoreductase, respectivamente. As seqüências de

nucleotídeos dos genes de dhaBCE têm sido descritas na literatura (veja, por exemplo Macis e outros, *FEMS Macrobiology Letters* 164:21-28 (1998) (*C. pasteurianum*); Seyfried e outros, *J. of Bacteriology* 178:5793-96 (1996) (*C. freundii)*; e Tobimatsu e outros, *J. Biol. Chem.* 271:22352-57 (1996) (*K. pneumoniae)*). As seqüências de nucleotídeos de gene dhaT têm sido descritos (veja, por exemplo, Leurs e outros, *FEMS Microbiol. Lett.* 154:337-45 (1997) (*C. Pasteurianum*); e Daniel e outros, *J. of Bacteriol.* 177:2151-56 (1995) (*C. freundii*)). Sondas específicas fornecidas por esta invenção incluem pares iniciadores baseados no gene dhaB de *K. pasteurianum* (por exemplo, como detalhado abaixo por via de concretizações ilustrativas em dhaB15'(NO de ID de SEQ: 1); dhaB13'(NO de ID de SEQ: 2); dhaB25'(NO de ID de SEQ: 3); dhaB23'(NO de ID de SEQ: 4); dhaB35'(NO de ID de SEQ: 5); e dhaB33'(NO de ID de SEQ: 6)) os quais são particularmente úteis para ampliar um polinucleotídeo de codificação de enzima de fermentação de glicerol, ou um fragmento disso, via reação de cadeia de polimerase ("PCR"). Tal par de iniciador pode ser usado para ampliar um segmento de um polinucleotídeo de codificação de enzima de fermentação de glicerol de um organismo de interesse, os qual pode sucessivamente ser usado como uma sonda para identificar e clonar a seqüência de codificação de comprimento completo do mesmo organismo ou diferente. Sondas podem ser rotuladas para identificar seqüências homólogas, por exemplo em uma biblioteca de cDNA. Alternativamente, sondas podem ser usadas como iniciadores para ampliar uma seqüência de polinucleotídeo flanqueada por seqüências reconhecidas pelos iniciadores, particularmente por meios de PCR ou RT-PCR. Em particular, a seqüência de interesse pode ser ampliada de uma biblioteca de cDNA ou genômica, de um organismo isolado, ou de uma amostra ambiental, como descrito em maiores detalhes abaixo.

Em uma concretização da invenção, a amostra a ser peneirada é uma amostra ambiental suspeita de abrigar um organismo termofílico, tal como uma amostra de água, solo ou barro coletada de um ambiente condutor a vida termofílica. Tipicamente, uma amostra ambiental será preparada em um modo tal que ácidos nuclêicos presentes na amostra estejam dispo-

níveis para interação com uma sonda complementar, por exemplo, um iniciador de PCR. Um polinucleotídeo de codificação de enzima de fermentação de glicerol, ou um fragmento disso, pode ser reconhecido por sua capacidade para hibridizar a uma sonda como descrito acima.

Um método preferido de isolar e clonar um polinucleotídeo da invenção de uma amostra ambiental é por meios de PCR. Esta técnica tira proveito da homologia de seqüência entre polinucleotídeos codificando enzimas homólogas, ou enzimas com atividade similar. O método emprega uma série de iniciadores baseada em uma seqüência de polinucleotídeo de codificação de enzima de fermentação de glicerol conhecida, ou uma porção disso, para ampliar uma seqüência de polinucleotídeo homóloga, ou um fragmento disso, de uma amostra ambiental. Os polinucleotídeos homólogos podem ser amplificados proveniente de DNA na amostra, particularmente DNA genômico de microorganismos na amostra, usando metodologia de PCR convencional bem conhecida na técnica. Alternativamente, os polinucleotídeos homólogos podem ser ampliado proveniente de RNA na amostra, particularmente mRNA ou RNA total, sintetizando uma cópia do primeiro filamento de cDNA de RNA e ampliando o cDNA via PCR, por exemplo, RT-PCR. Usando técnicas conhecidas àqueles peritos na técnica, um pode ajustar as condições de recozimento da reação para permitir hibridização de iniciadores a um nível desejado de homologia, desse modo permitindo a ampliação de seqüências dividindo mais ou menos homologia com a seqüência na qual os iniciadores são baseados. Este método permite o isolamento de uma estrutura de leitura aberta ("OFR") de codificação de enzima de fermentação de glicerol completa, ou um fragmento disso. Um ou mais fragmentos de uma OFR de codificação de enzima de fermentação de glicerol podem ser clonados e unidos para produzirem um ORF completo. A ORF de codificação de enzima de fermentação de glicerol ampliada pode então ser usada para expressar a enzima de fermentação de glicerol codificada na prática de vários aspectos da invenção. Por exemplo, a seqüência pode ser introduzida dentro de uma célula hospedeira, desse modo habilitando a célula hospedeira fermentar glicerol. Alternativamente, a enzima expressa

pode ser purificada para aplicações tais como fermentação de livre de célula. Alternativamente, a seqüência de ORF pode por si só ser usada para designar novos iniciadores e sondas para a detecção adicional e isolamento de novas seqüências de codificação de enzima de fermentação de glicerol termostável.

Em outra concretização da invenção, a amostra é uma biblioteca de polinucleotídeo, preferivelmente uma biblioteca genômica ou de cDNA preparada de um organismo termofílico, especialmente um organismo conhecido para ser capaz de fermentar glicerol para 1,3-propanodiol. Para histórico geral em técnicas de biologia molecular e como preparar uma biblioteca de cDNA e uma biblioteca genômica, veja, por exemplo, Ausubel e outros, *supra*, Sambrook e outros, *supra*; e No. de Patente U.S. 5.650.148. A biblioteca pode ser peneirada usando técnicas de peneiramento de hibridização de ácido nuclêico em conjunção com as sondas rotuladas apropriadas, como descrito acima. Técnicas de peneiramento são descritas, entre outros locais, em Benton e Davis, *Science* 196:180 (1977) (bibliotecas de bacteriófagos) e Grunstein e Hogness, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:3961-65 (1975) (biblioteca de plasmídeo), quais publicações são incorporadas aqui contidas por referência.

Em ainda outra concretização da invenção, a amostra compreende um organismo ou organismos isolados, ou uma biblioteca de polinucleotídeo gerada de um organismo ou organismos isolados, dos quais um polinucleotídeo da invenção pode ser ampliado usando PCR ou RT-PCR. Preferivelmente, o organismo ou organismos isolados usados são termofílicos e capazes de fermentar glicerol.

Em uma concretização da invenção, uma biblioteca de expressão é construída a qual está apta a direcionar a expressão dos produtos de genes codificados pelos constituintes do polinucleotídeo da biblioteca.

Em uma concretização particularmente preferida da invenção, uma biblioteca de expressão é funcionalmente peneirada testando seus constituintes para a capacidade de codificar um produto de gene que catalisa uma etapa na fermentação de glicerol, Em uma concretização preferida,

um organismo que é normalmente incapaz de fermentar glicerol a 1,3-propanodiol é transformado com um constituinte de uma biblioteca de DNA como descrito acima, preferivelmente uma biblioteca preparada de um organismo termofílico conhecido na técnica a ser capaz de fermentar glicerol. Os organismos termofílicos são então peneirados para a capacidade de fermentar glicerol a 1,3-propanodiol por seu crescimento anaeróbio em glicerol. Os microorganismo transformados pode ser peneirados para a produção de 1,3-propanodiol e/ou acetato. A capacidade para crescer anaerobiamente em glicerol, ou para produzir 1,3-propanodiol e/ou acetato, indica que o constituinte da biblioteca usado para transformar o organismo codifica uma enzima que está apta a fornecer uma atividade enzimática exigida para a fermentação de glicerol. O constituinte da biblioteca pode então ser clonado e caracterizado por técnicas padrões e usado na prática de vários aspectos da instante invenção.

O microorganismo transformado na estratégia de clonagem funcional descrito acima pode ser um que inerentemente precisa capacidade para fermentar glicerol, ou um microorganismo que tem perda da capacidade para fermentar glicerol como o resultado de uma mutação, por exemplo, uma mutação nula em um dos genes exigidos para fermentação de glicerol. Tal mutação pode ser projetada em um organismo usando técnicas bem conhecidas na técnica. O microorganismo pode, mas não precisa necessariamente ser, termofílico. É preferível que o organismo de teste possua não todas mas uma das atividades enzimáticas exigidas para fermentação de glicerol, de modo que a capacidade para fermentar glicerol possa ser recuperada pela introdução de uma única atividade enzimática.

Alternativamente, os produtos de genes expressos podem ser imunologicamente peneirados usando técnicas padrões em conjunção com anticorpos aumentados contra uma enzima de fermentação de glicerol. Para tais técnicas de peneiramento, veja, por exemplo, ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL (Harlow e Lane, eds. 1988).

5.4. Organismos Recombinantes Capazes de Fermentar Glicerol a 1,3-Propanodiol

A instante invenção também fornece um organismo recombinante que tenha sido geneticamente projetado para expressar uma ou mais enzimas de fermentação de glicerol termoestáveis exógenas, isto é, heterólogas. O termo "exógeno", quando usado neste contexto, indica que enzima é codificada por uma seqüência de codificação de polinucleotídeo heteróloga, isto é, uma seqüência de polinucleotídeo que não é nativa, ou endógena, ao organismo hospedeiro. Em uma concretização preferida, o organismo recombinante é projetado para expressar uma enzima de fermentação de glicerol termoestável derivada de *C. viterbiensis*, ou uma enzima que é homóloga a tal enzima. Em uma concretização particularmente preferida, o organismo recombinante é projetado para expressar uma desidratase ou 1,3-propanodiol oxidoreductase derivado de uma classe de *C. viterbiensis*, tais como JW/MS-VT5^{T}.

Um organismo recombinante da invenção pode ser útil na prática de vários aspectos da presente invenção por exemplo, o organismo recombinante pode ser usado como um catalisador em um processo para biologicamente converter glicerol a 1,3-propanodiol . Em outra concretização não limitante, o organismo recombinante pode servir como a fonte de uma enzima de fermentação de glicerol termoestável, a qual pode ser isolada usando técnicas de purificação de proteína familiares àqueles artífices na técnica.

A invenção fornece uma variedade de vetores e cassetes de transformação e expressão adequados para clonar, transformação e expressão de uma seqüência de polinucleotídeo codificando uma enzima de fermentação de glicerol termoestável, ou um fragmento disso. Vetores adequados serão aqueles os quais são compatíveis com o microorganismo hospedeiro e o uso pretendido do microorganismo recombinante resultante. Por exemplo, um vetor adequado pode ser derivado de um plasmídeo, um vírus (tal como bacteriófago T7 ou um fago derivado de M13), ou um cosmídeo. Protocolos para obter e usar tais vetores são conhecidos aqueles na técnica. Veja. por exemplo, Sambrook e outros, *supra*.

Tipicamente, o vetor ou cassete contém seqüências direcionando transcrição e tradução do gene relevante, um marcador selecionável, e

seqüências permitindo reprodução autônoma ou integração cromossomal. Vetores adequados compreende uma região 5' da seqüência de codificação que abriga controles de iniciação transcripcional e uma regiào 3'da seqüência de codificação que controla término transcripcional. Em uma concretização, regiões de controle são derivadas de genes homólogas a célula hospedeira transformada.

Vetores recombinantes da presente invenção, particularmente vetores de expressão, são preferivelmente construídos de modo que a seqüência de codificação esteja em associação operativa com um ou mais elementos reguladores necessários para a transcrição e tradução da seqüência da seqüência de codificação. Como usado aqui contido, o termo "elemento regulador" inclui mas não é limitado a seqüências de nucleotídeos que codificam promotores indutíveis e não indutíveis, realçadores, operadores e outros elementos conhecidos na técnica a direcionar e/ou regular expressão de seqüências de codificação de nucleotídeo. Também, como usado aqui contido, a seqüência de codificação é uma "associação operativa" com um ou mais elementos reguladores onde os elementos reguladores efetivamente regulam ou permitem a transcrição da seqüência de codificação ou a tradução de seu mRNA, ou ambos.

Os elementos reguladores destes vetores podem variar em sua força e especificidades. Dependendo do sistema de hospedeiro/vetor utilizado, qualquer um dos vários elementos de transcrição ou tradução adequados podem ser usados. Exemplos não limitantes de regiões reguladoras transcripcionais ou promotores para bactérias incluem o promotor β-gal, o promotor T7, o promotor TAC, promotores esquerdo e direito lambda, promotores trp e lac, e os promotores de fusão trp-lac.

Métodos gerais de expressar proteínas recombinantes são bem conhecidos na técnica, como exemplificado em R. Kaufman, *Methods in Enzymology* 185:537-566 (1990). Optativamente, a seqüência heteróloga pode codificar uma proteína de fusão incluindo um peptídeo de identificação terminal N conferindo características desejadas, por exemplo, estabilização ou purificação simplificada de produto recombinante expresso.

Para direcionar a enzima de fermentação de glicerol no caminho secretor das células hospedeiras, uma seqüência de sinal secretora pode ser fornecida no vetor de expressão. A seqüência de sinal secretora é unida a seqüência de polinucleotídeo codificando a enzima de fermentação de glicerol na estrutura de leitura correta. Seqüências de sinais secretoras são comumente posicionadas 5' a seqüência de codificação. A seqüência de sinal secretora pode ser aquela normalmente associada com uma proteína secretada pelo organismo hospedeiro.

Uma vez um vetor de transformação ou expressão adequado ter sido construído, pode ser usado para transformar uma célula hospedeira apropriada, usando procedimentos conhecidos tais como, por exemplo, células permeabilizadas a cálcio, eletroporação, transformação de protoplasto, ou por transfecção usando um vírus de fago recombinante. Hospedeiros de expressão adequados incluem *E. coli*, *Bacillus subtilil*, *Salmonella typhimurium* e espécies de vírus dentro do gênero *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, e *Staphylococcus*, embora outras possam ser empregadas como um material de escolha.

Em uma concretização preferida, a invenção fornece uma microorganismo recombinante termofílico que tem sido projetado para expressar uma ou mais enzimas de fermentação de glicerol termoestáveis. Tais microorganismos são particularmente úteis na conversão biológica de glicerol a 1,3-propanodiol, como descrito *infra*. Exemplos de microorganismos termofílicos incluem membros do gênero *Bacillus*, *Thermus*, *Sulfolobus*, *Thermoanaerobacter*, *Thermobrachium*, e *Caloramator*.

O microorganismo de hospedeiro selecionado preferivelmente será apto a produzir o co-fator adenosil-cobalamina (coenzima B_{12}). Se necessário, genes de síntese B_{12} podem ser introduzidos o microorganismo e/ou o meio pode ser suplementado com vitamina B_{12}.

5.5. Métodos de Isolar Enzimas de Fermentação de Glicerol Termoestáveis

A instante invenção fornece um método para preparar e isolar uma enzima de fermentação de glicerol termoestável. Em uma concretização preferida, a enzima é fornecida em uma forma substancialmente purificada.

Em uma concretização não limitante, a enzima é isolada de um microorganismo termofílico que expressa uma enzima de fermentação de glicerol termoestável. Em outra concretização não limitante, a enzima é isolada de um organismo recombinante projetado para expressar uma seqüência de polinucleotídeo exógena codificando uma enzima de fermentação de glicerol termoestável. Alternativamente, uma enzima termoestável da invenção pode ser preparada usando procedimentos de sínteses de peptídeos de fase de solução ou sólidos convencionais, como descrito em, por exemplo CREIGHTON, *SUPRA*.

Células hospedeiras expressando a enzima de fermentação de glicerol termoestável de interesse são tipicamente cultivadas em um meio nutriente adequado para produção da enzima, usando métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, a célula pode ser cultivada por cultivação em frascos de agitação, fermentação em pequena escala ou grande escala (incluindo fermentações contínuas, em batelada, retro-batelada, ou estado sólido) em fermentadores de laboratório e industrial executados em um meio adequado e sob condições permitindo a enzima ser expressa e/ou isolada. Um meio de nutriente adequado tipicamente compreende fontes de carbono e nitrogênio e sais inorgânicos, usando procedimentos conhecidos na técnica. Meios adequados estão disponíveis de fornecedores comerciais, ou podem ser preparados de acordo com composições publicadas (por exemplo, em catálogos da American Type Culture Collection).

Dependendo da natureza da célula do hospedeiro e vetor de expressão usados, a enzima pode ser retida no citoplasma, frequentemente como grânulos insolúveis (conhecidos como corpos de inclusão), ou podem ser direcionados ao espaço periplásmico por uma seqüência de secreção bacterial. No caso do formador, as células são quebradas e os grânulos são recuperados e desnaturados, após a qual a enzima é redobrada diluindo o agente desnaturante. No último caso, a enzima pode ser recuperada do espaço periplásmico rompendo as células, por exemplo, por sonicação ou choque osmótico, para liberar os conteúdos do espaço periplásmico e recuperando a enzima. Se a enzima é secretada no meio do nutriente, ela pode ser

recuperada diretamente do meio.

Enzima produzida pelas células pode ser então recuperada por meios de técnicas convencionais conhecidos na técnica, incluindo, mas não limitado a, centrifugação, filtração, extração, secagem, evaporação, solubilidade diferencial (por exemplo, precipitação de sulfato de amônio), cromatografia (por exemplo, troca de íon, afinidade, hidrofóbico, cromatofocalização, e exclusão por tamanho) ou procedimentos eletroforéticos (por exemplo, focalização isoelétrica preparativa (IEF) (*veja*, por exemplo, PROTEIN PURIFICATION (Janson e Ryden eds., 1989); SCOPES, PROTEIN PURIFICATION: PRINCIPLES AND PRATICE (1994); Sambrook e outros, *supra*, e Ausubel e outros *supra*.

Em uma concretização preferida, a enzima é purificada como uma proteína de fusão incluindo um elemento de fusão eu facilita purificação por afinidade rápida. Elementos de fusão de purificação úteis incluem rótulos de histidina e glutationa S-transferase (GST). Um sítio de reconhecimento de protease, por exemplo, um sítio de reconhecimento de trombina ou fator Xa, pode ser incluído para permitir divisão do produto de proteína desejado do elemento de fusão. Vetores úteis para a construção de sistemas de expressão de fusão de gene estão comercialmente disponíveis, por exemplo de Amersham Pharmacia Biotech, Inc. (Piscataway, NJ).

Protocolos de purificação de proteína específicos úteis para isolar enzimas de fermentação de glicerol têm sido descritos na literatura (*veja, por exemplo,* Seyfried e outros, *J. of Bact.* 178:5793-96 (glicerol desidratase); Tobimatsu e outros, *J. of Bact.* 181:4110-13 (1996) (glicerol desidratase); e Johnson e outros, *J. of Bact.* 169:2050-54 (1987)(1,3-propanodiol oxireductase) Por exemplo, Seyfried e outros descreve o uso de uma vitamina B_{12}-resina de agarose como uma matriz de afinidade para a purificação de glicerol desidratase.

5.6. Métodos de Biologicamente Converter Glicerol a 1,3-Propanodiol

A presente invenção fornece métodos biológicos para converter glicerol a 1,3-propanodiol. Como usado aqui contido, uma método "biológico" de converter glicerol a 1,3-propanodiol é um método que emprega um catali-

sador biológico, por exemplo, uma enzima de fermentação de glicerol, ou como um constituinte de um microorganismo ou em um sistema de reação catalisado por enzima livre de célula. Em particular, a invenção fornece processos de conversão biológica que podem ser realizados em altas temperaturas, catalisado por um organismo termofílico e/ou enzima termoestável. Em uma concretização preferida, o método é realizado em temperaturas maiores do que 50°C, mais preferivelmente em temperaturas maiores do que 60°C, e emprega um microorganismo termofílico capaz de fermentar glicerol a 1,3-propanodiol.

Em uma concretização não limitante, o processo emprega um microorganismo termofílico que naturalmente expressa um complemento completo de enzimas de fermentação de glicerol termoestáveis a 1,3-propanodiol, por exemplo, 1,3-propanodiol oxidoreductase, glicerol desidratase e/ou diol desidratase. Em uma concretização particularmente preferida, uma classe de *C. viterbiensis*, por exemplo, classe de JW/MS-VS5^{T}, é empregada como o catalisado biológico.

Em uma concretização alternativa, o processo emprega um microorganismo recombinante, preferivelmente um microorganismo recombinante termofílico, que tem sido geneticamente projetado para expressar uma ou mais enzimas de fermentação de glicerol de termoestáveis exógenas. Exemplos de microorganismos termofílicos incluem membros do gênero *Bacillus, Thermus, Sulfolobus, Thermoanaerobacter, Thermobrachium*, e *Caloramator*. O termo "exógeno", quando usado neste contexto, indica que enzima é codificada por uma seqüência de codificação de polinucleotídeo heteróloga, isto é, uma seqüência de polinucleotídeo que não é nativa, ou endógena, ao organismo hospedeiro termofílico. Em uma concretização preferida, a seqüência de polinucleotídeo heterólogo codifica uma enzima de fermentação de glicerol termoestável derivada de *C. viterbiensis,* ou uma enzima que é homóloga tal enzima. Em uma concretização particularmente preferida, a seqüência de polinucleotídeo heteróloga é derivada de uma classe de *C. viterbiensis*.

Optativamente, um microorganismo termofílico usado no proces-

so da invenção pode produzir o co-fator adenosil-cobalamina (coenzima B_{12}). Se necessário, genes de síntese de B_{12} podem ser introduzidos o microorganismo e/ou o meio podem ser suplementados com vitamina B_{12}.

A invenção além disso fornece um processo de fermentação para a bioconversão de glicerol a 1,3-propanodiol usando um organismo termofílico da invenção. As condições de fermentação deveriam ser otimizadas, equilibrando custo e conveniência com rendimento de produto e eficiência. O desenvolvimento de um processo de fermentação comercial tipicamente ocorre em um modo em forma de etapa, inicialmente usando frascos pequenos, então fermentadores maiores (sob 10 galões), fermentadores de tamanho intermediários (até diversas centenas de galões), e finalmente, fermentadores de grande escala (milhares de galões). Em cada estágio de produção, condições de desenvolvimento são ajustadas para produzir rendimentos máximos e custos mínimos. A composição orgânica e inorgânica do meio, bem como o pH, temperatura, e concentração de oxigênio, são os fatores principais que são variados para maximizar a eficiência do processo de produção. Mesmo em um processo de batelada, condições são frequentemente variadas durante fermentação para alcançar o rendimento de produto máximo, e condições são monitoradas durante o processo de fermentação para assegurar que parâmetros críticos permanecem dentro de limites permissíveis. As câmaras de reação e soluções de substratos deveriam ser esterilizadas antes da adição da classe microbial ser usada no processo de produção. Quando fermentando uma temperatura inferior, infecção da reação com contaminantes microbiais podem facilmente levar a deslocamento competitivo da classe sendo empregada para produzir o produto, com resultados obviamente nocivos. Uma vantagem importante da presente invenção é que usando organismos termofílicos e/ou enzimas termoestáveis, a reação pode ser realizada em temperaturas altas onde a maioria dos contaminantes potenciais não estão disponíveis.

A composição do meio de fermentação deve incluir os nutrientes essenciais para fornecer o crescimento do microorganismo e formação do produto desejado. Nutrientes essenciais incluem fontes, de carbono, nitrogê-

nio e fósforo. A escolha de uma fonte nutritiva particular é feita em elementos econômicos bem como biológicos. Dependendo da natureza do processo de fermentação, todos os ingredientes cru podem ser adicionados no início da fermentação, ou nutrientes podem ser alimentados aos microorganismos gradualmente através do processo.

O pH da reação pode substancialmente afetar fermentação. As enzimas envolvidas em formar o produto desejado todas têm limites de pH ótimo para atividade máxima e limites de pH limitados nos quais atividade é mantida. O crescimento rápido de organismos em um fermentador pode rapidamente alterar o pH do meio de reação. Por exemplo, a acumulação de ácido, por exemplo, ácido acético, pode originar o pH de meio não compensado a declinar precipitadamente, inibindo ou detendo a produção do produto de fermentação desejado. Para prevenir tais mudanças, o meio de fermentação deveria ser compensado a mudanças de pH úmidas. Adicionalmente, o pH da solução de reação normalmente é continuamente monitorada, e ácido ou base é adicionada como necessário para mantê-lo dentro dos limites de tolerância aceitáveis. Em processos de fermentação empregando classe JW/MS-VS5^T, o pH do meio deveria ser mentido entre aproximadamente 5,0 e 7,8, preferivelmente entre aproximadamente pH 6,0 e 6,5.

A temperatura de reação deveria também ser cuidadosamente regulada para alcançar rendimento ótimo de produto. serpentinas de aquecimento podem ser usadas para manter temperaturas elevadas de modo a alcançar taxas ótimas de formação de produto e para inibir infecção por contaminantes microbiais. As serpentinas de aquecimento podem também ser usadas para esterilização periódica da câmara do fermentador. Fermentação pode ser realizada em qualquer temperatura consistente com atividade e viabilidade do microorganismo. Em uma concretização preferida a invenção é realizada em uma temperatura de pelo menos 40°C, preferivelmente em uma temperatura de pelo menos 50°C, e mais preferivelmente em uma temperatura de 60°C ou maior. Em processo de fermentação empregando classe de JW/MS-VS5^T, a temperatura deveria ser mantida entre 33 e 64°C, preferivelmente entre 50 e 64°C, e mais preferivelmente enter 57 e 64°C.

Além de seus parâmetros ambientais, um processo de fermentação pode ser designado como um processo em batelada, o qual é análogo para inoclular um frasco contendo um caldo com uma cultura microbial, como um processo de fluxo contínuo, o qual é analogamente aquele de um quimiostato. A escolha do plano do projeto depende da produção e recuperação econômica ou ambos do produto desejado. Comparado a processos em batelada, fermentadores através do fluxo são mais propensos a contaminação com organismos indesejados, os quais podem tornar controle de qualidade difícil a manter-se, particularmente se a fermentação é conduzida e uma temperatura moderada. O plano através do fluxo, entretanto, tem a vantagem de produzir um fornecimento contínuo que pode ser recuperado em uma taxa constante para distribuição comercial. Por sua natureza verdadeira, processos em batelada exigem tempo de início significante para iniciar o processo de fermentação, tempos de incubação para permitir produtos de fermentação acumularem, e tempos de recuperação durante os quais o produto é separado do meio gasto e células microbiais.

Em outra concretização da invenção, o processo pode ser usado para converter um substrato de carbono fermentável outro além de glicerol a 1,3-propanodiol. Em uma concretização não limitante, um microorganismo termofílico capaz de converter um substrato de carbono fermentável, por exemplo, um monosacarídeo tal como glicose ou um polisacarídeo, a glicerol pode ser projetado para produzir 1,3-propanodiol recombinantemente introduzindo no microorganismo o complemento de enzimas produtoras de 1,3-propanodiol termoestáveis necessárias para converter glicerol a 1,3-propanodiol. Estas enzimas podem ser derivadas de um organismo termofílico capaz de converter glicerol a 1,3-propanodiol, por exemplo *C. viterbiensis*. Técnicas para recombinantemente projetar a atividade enzimática exigida para fermentar glicerol em 1,3-propanodiol em um organismo não termofílico são descritas em No. de Patente U.S. 5.685.276, incorporado aqui contido por referência em sua integridade.

Alternativamente, um microorganismo recombinante da invenção pode ser projetado para fermentar fontes de carbono outras além de glicerol

a 1,3-propanodiol. O uso de tais organismos podem ser vantajosos, particularmente para a produção de 1,3-propanodiol de fontes de carbono econômicas tais como glicose ou polisacarídeos fermentáveis. Por exemplo, um microorganismo capaz de fermentar glicerol a 1,3-propanodiol pode ser projetado a converter um intermediário glicolítico, por exemplo, fosfato de dihidroxiacetona, em glicerol, desse modo permitindo a introdução de carbono de fontes de não glicerol no caminho de fermentação. WO 98/21340, incorporada aqui contida por referência em sua integridade, descreve métodos para a produção de glicerol de um organismo recombinante transformando uma célula hospedeira adequada com um cassete de expressão compreendendo ou um ou ambos gene codificando uma enzima de gliecerol-3-fosfato desidrogenase e um gene codificando uma enzima glicerol-3-fosfato fosfatase. Tais organismos estão aptos a fermentar açúcares simples, por exemplo, glicose, em glicerol. Estes organismos, ou realmente qualquer organismo geneticamente projetado para produzir estas enzimas ou enzimas de caminho sintético de glicerol alternativas, podem ser usadas como células hospedeiras para a fermentação adicional de glicerol a 1,3-propanodiol usando as composições e métodos da invenção. Além disso, WO 98/21339, incorporado aqui contido por referência em sua integridade, descreve microorganismos recombinantes projetados a expressar genes codificando glicerol-3-fosfato desidrogenase, glicerol-3-fosfatase, glicerol desidratase e 1,3-propanodiol oxidoreductases e desse modo permitido converter glicose e outros açúcares a 1,3-propanodiol. Assim esta estratégia pode ser aplicada a um perito na técnica para produzir 1,3-propanodiol de qualquer substrato de carbono que possa ser convertido a ou glicerol, dihidroxiacetona, compostos C_3 no estado de oxidação de glicerol (por exemplo, glicerol 3-fosfato), ou composto C_3 no estado de oxidação de dihidroxiacetona (por exemplo, fosfato de dihidroxiacetona ou 3-fosfato gliceraldeído) (veja, por exemplo, WO 98/21339).

Em outra concretização da invenção, o organismo termofílico recombinante usado pode ser projetado para expressar, ou expressa em níveis acentuados, uma proteína capaz de suprimir a inativação de uma en-

zima de fermentação de glicerol. Por exemplo, técnicas descritas em WO 98/21341, incorporadas aqui contidas por referência em sua integridade, podem ser usadas para introduzir a expressão de uma enzima capaz de reverter a inativação mediada por substrato de glicerol desidratase.

O processo da invenção é realizado em um meio que contém o substrato de carbono a ser convertido em 1,3-propanodiol, preferivelmente como a fonte de carbono única ou primária. Em uma concretização preferida, um meio basal é usado onde glicerol está presente como a fonte de carbono única ou primária. Além de uma fonte de carbono apropriada, meio de fermentação deve conter minerais, sais, cofatores, compensadores, e outros componentes adequados, conhecidos aqueles peritos na técnica, adequados para o crescimento das culturas e promoção das atividades enzimáticas necessárias para a produção de 1,3-propanodiol. Atenção particular deveria ser dada a sais de Co(II) e/ou vitamina B_{12} ou precursores disso. Um exemplo não limitante de um meio adequado para uso na conversão de glicerol a 1,3-propanodiol por *C. viterbiensis* é fornecido abaixo nos Exemplos.

O processo da invenção pode ser realizado sob condições aeróbias e anaeróbias, onde condições aeróbias ou microaeróbias são preferidas. Em uma concretização particularmente preferida o processo é realizado sob uma atmosfera de nitrogênio ou argônio, por exemplo, sob uma atmosfera de N_2/CO_2 em razão de 80:20. Produtos químicos podem também ser adicionados os quais reagem com e removem oxigênio molecular do meio de crescimento. Por exemplo tioglicolato de sódio reagirá com oxigênio livre e o removerá da solução. Similarmente, a cisteína de amino ácido e outros compostos contendo grupos sulfidril podem ser usados para limpar oxigênio molecular de um meio de crescimento. Para culturas líquidas, nitrogênio pode ser borbulhado através do meio para remover ar em traços de oxigênio, após o qual o recipiente da cultura é estreitamente vedado para prevenir oxigênio de reentrar.

Adicionalmente, uma câmara de cultura anaeróbia pode ser empregada para excluir oxigênio da atmosfera. Formas comuns de câmaras anaeróbias, tais como sistema de Gas Pak, geram hidrogênio, o qual reage

com o oxigênio como um catalisador dentro da câmara para produzir água. Dióxido de carbono é também gerado neste sistema para substituir o volume de gás esgotado pela conversão de oxigênio a água.

1,3-Propanodiol pode ser identificado diretamente submetendo o meio a análise de cromatografia líquida de pressão alta (HPLC). Por exemplo, meio de fermentação pode ser analisado em uma coluna trocadora de íon analítica usando uma fase móvel de ácido sulfúrico 0,01 N em um modelo isocrático. Alternativamente, 1,3-propanodiol pode ser identificado usando outras técnicas analíticas apropriadas, incluindo, mas não limitado a, cromatografia gasosa (GC) e cromatografia gasosa-espectroscopia de massa (GC-MS).

1,3-propanodiol pode ser purificado proveniente do meio de fermentação usando técnicas conhecidas aqueles artífices peritos, incluindo destilação, centrifugação, filtração e separação cromatográfica. Por exemplo, propanodióis podem ser obtidos de meio celular sujeitando a mistura de reação a extração com um solvente orgânico, destilação e cromatografia de coluna, como descritos, por exemplo, em No. de Patente U.S. 5.356.812, incorporada aqui contida por referência em sua integridade. Um solvente orgânico particularmente bom para este processo é ciclohexeno, como descrito em No. de Patente U.S. 5.008.473.

Alternativamente, 1,3-propanodiol pode ser produzido em um sistema de fermentação empregando enzimas e/ou células microbiais adsorvidas ou ligadas a um suporte sólido, tal como celulose. As enzimas ligadas e assim imobilizadas atuam como um catalisador de superfície sólida. Uma solução contendo o substrato de reação, por exemplo, glicerol, é então passado através da superfície sólida. Temperatura, pH e concentração de oxigênio são estabelecidos em níveis ótimos para alcançar taxas máximas de conversão. Este tipo de processo é particularmente apropriado quando a transformação desejada envolve uma única etapa metabólica, por exemplo, a conversão de tal intermediário a 1,3-propanodiol. O processo é mais complexo quando atividades enzimáticas múltiplas as exigidas para converter um substrato inicial em um produto desejado. Geralmente o meio do processo

deve incluir quaisquer fatores ancilares para catálise, tais como cofatores de enzima (por exemplo, vitamina B_{12}) e equivalentes redutores. O produto desejado pode ser purificado do meio de fermentação usando as técnicas descritas *supra*. Quando usando tais sistemas imobilizados, é essencial fornecer condições que mantenham atividade enzimática e minimizem a inativação ou perda e enzima. Quando células inteiras, em vem de enzimas livres de células, são empregadas em tais sistemas imobilizados, é importante manter viabilidade dos microorganismos durante o processo. Este processo usando células imobilizadas geralmente envolve adicionando substratos de crescimento necessários.

O processo de acordo com a invenção permite glicerol ser convertido substancialmente estequiometricamente dentro de 1,3-propanodiol. O rendimento de 1,3-propanodiol é frequentemente da ordem de 2 moles de 1,3-propanodiol proveniente de 3 moles de glicerol. No contexto presente, substancialmente é compreendido a consumo de glicerol médio de pelo menos 80%, e preferivelmente pelo menos 95%.

O 1,3-propanodiol produzido por métodos e composições da invenção é útil na produção de poliésteres e películas. Por exemplo, poli(tereftalato de 1,3-propileno) (PPT) tem sido sintetizado por Whinfield e Dickson usando 1,3-propandiol como o material inicial. As propriedades físicas de PPT são superiores do que aquelas do poliéster poli(tereftalato de etileno) (PET) geralmente disponível comercialmente. Outros processos para sintetizar PPT são descritos em, por exemplo, Nos. de Pat. U.S. 5.340.909 e 5.872.204, incorporado por referência aqui contido. Outros polímeros podem também ser sintetizados.

Os exemplos seguintes são fornecidos para ilustrar, mas não limitar, a instante invenção.

6. EXEMPLO: Isolamento de classe do tipo JW/MS-VS5^T de *C. viterbiensis*

6.1. Materiais e Métodos

6.1.1. Fonte de organismo

A classe foi isolada de uma amostra de sedimento/água misturada coletada de uma fonte quente de água fresca na área de Bagnaccio

Spring próximo a Viterbo, Itália, em Junho de 1977. Temperaturas em pontos de amostragem foram 63°C e o pH foi 6,6-6,7. Condições são descritas mais completamente em Canganella e outros, *J. Basic Microbiol.* 35:9-19 (1995), incorporado por referência aqui contido em sua integridade.

6.1.2. Meio e cultivo

Um meio basal usado para enriquecimento, isolamento e cultivo foi preparado pela técnica de Hungate modificada sob fase de gás N_2/CO_2 (80:20), como descrito em Ljungdahl e outros, MANUAL OF INDUSTRIAL MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY (Demain e Solomon eds, 1896). O meio basal continha (por litro de água deionizada): 0,5 g de $(NH_4)_2SO_4$, 0,5 g de NH_4Cl, 2,0 g de KH_2PO_4, 0,04 g de $MgCl_2*6H_2O$, 0,04 g de $CaCl_2*2H_2O$, 4,2 g de $NaHCO_3$, 0,13 g de Na_2S*9H_2O, 0,13 g de cisteína-HCl, 0,3 g de extrato de levedura, 0,001 g de resazurina, 3,0 g de glicerol, 2 ml de solução de vitaminas (descrito em Wolin e outros, *J. Biol. Chem.* 238:2882-86 (1963)) e 1 ml de solução de elementos de traço. A solução de elementos de traço continha (mmol/l): 2,0 $(Na_4)_2Fe(SO_4)_2*6H_2O$, 1,0 de $CoCl_2*6H_2O$, 1,0 de $(NH_4)_2Ni(SO_4)_2*6H_2O$, 0,1 de $Na_2MoO_4*2H_2O$, 0,1 de $Na_2WO_4*2H_2O$, 0,5 de $ZnSO_4*7H_2O$, 0,01 $CuCl_2*2H_2O$, 0,5 de Na_2SeO_3, 0,1 de H_3BO_3, 0,5 de $MnCl_2*4H_2O$, e 0,01 $AlK(SO_4)_2*12H_2O$. O pH foi ajustado a 6,0 (a 25°C). Enriquecimentos e culturas puras cresceram geralmente em 10 ml de meio em tubos de Hungate sob uma atmosfera de N_2/CO_2 (80:20). Todas incubações foram a 60°C a não ser que de outro modo mencionado.

6.1.3. Determinação de crescimento

Crescimento de bactéria foi determinado medindo o aumento em densidade ótica a um comprimento de onda de 600 nm (Spectronic 21, Bausch & Lomb, Rochester, NY).

6.1.4. limites de pH e temperatura

Para a determinação do limite de pH para crescimento, o pH foi determinado a 25°C usando um modelo de medidor de pH de 815 MP (Fisher Scientific, Pittsburg, PA). Limite de temperatura para crescer foi determinado usando um incubador de gradiente de temperatura (Scientific Industries, Inc., Bohemia, N.Y.) sob (15 spm) em meio basal a pH^{25c} 6,0.

6.1.5. Utilização de substrato

A capacidade do organismo utilizar substratos diferentes foi testada usando o meio basal suplementado com substratos autoclavados ou esterilizados por filtro de glicerol. As culturas foram incubadas por duas semanas e monitoradas para crescer medindo densidade óptica.

6.1.6. Receptores de Elétrons

O uso potencial de receptores de elétrons diferentes foi estudado no meio basal contendo glicerol (3g/l) como substrato. Os receptores de elétrons diferentes foram adicionados proveniente de soluções de matéria-prima autoclavadas. Culturas cultivadas em meio basal foram usadas como um inóculo (10 % de v/v). O uso dos receptores de elétrons (10mM) foi monitorado por determinação de produção de nitrito (para nitrato), produção de sulfeto (para sulfato e enxofre elementar) ou mudança de cor (AQDS).

6.1.7. Suscetibilidade de antibiótico

Suscetibilidade para antibióticos foi determinada transferindo uma cultura exponencialmente crescente em meio basal fresco contendo 100 g/ml de antibióticos de filtro esterilizado. As culturas foram incubadas por duas semanas.

6.1.8. Microscopia

Examinações de rotina foram executadas usando microscopia eletrônica (modelo PM 10AD, Olympus Optical Co., Ltda, Tóquio, Japão, equipado com óticas de contraste de fase). Transmissão de microscopia eletrônica foi executada com um modelo de microscópio eletrônico 100CX (JEOL, Tóquio, Japão). As amostras usadas para seccionamento ultrafino foram preparadas usando uranil acetato e guiam citrato para formação de mancha posterior como descrito por Spurr, *J. Ultrastruc. Res.* 26:31-43 (1969). Formação de mancha de gram foi executado pelo método de Hucker (Doetsch em MANUAL OF METHODS FOR GENERAL MICROBIOLOGY (Gerhardt e outros, eds. 1981)).

6.1.9. Técnicas analíticas

Determinação de glicerol, glicose, ácidos orgânicos de cadeia curta e álcoois foi executada por cromatografia líquida de alto desempenho

(HPLC) como previamente descrito em Svetlitshnyi e outros, *Int. J. Syst. Microbiol.* 46:1131-37(1996). Hidrogênio molecular foi analisado por cromatografia gasosa (Svetlitshnyi e outros). Produção de nitrito foi medida usando um kit de análise enzimático de Boehringer Mannheim (no. de catálogo 905608). Sulfito foi determinado pelo método de Cord-Ruwisch, *J. Microbiol. Methods.* 4:33-36 (1985).

6.1.10. Conteúdo de G+C de DNA

O DNA foi isolado e purificado usando o protocolo de purificação de DNA Genômico QIAGEN de acordo com as instruções do fabricante. O DNA foi digerido enzimaticamente, e o conteúdo de guanina-mais-citosina (G+C) foi determinado separando os nucleosídeos por HPLC como descrito por Whitman e outros, *Syst. Appl. Microbiol.* 7:235-240 (1986) e Mesbah e outros, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39:159-167 (1989).

6.1.11. Determinação de seqüência de gen de rRNA 16S e análise filogenética

A extração de DNA genômico, ampliação por PCR do gene de rRNA 16S e sequenciamento dos produtos PCR purificados foram realizados como descrito em Rainey e outros, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46:28-96 (1996). Produtos de reação de seqüência foram purificados por precipitação de etanol e eletroforisado com um modelo 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, Calif.). As seqüências de gene rRNA 16S obtidas neste estudo foram alinhadas contra as seqüências G+C de gram positivos baixos previamente determinados disponíveis dos dados públicos usando o editor ae2 Maidak e outros, *Nucleic Acids Res.* 27:171-173 (1999). Os programas do pacote PHYLIP incluindo DNADIST e NEIGHBOR foram usados para a análise filogenética (Felsenstein (1993), phylogenetic inference package, versão 3.5.1 Department of Genetics, University of Washington, Seattle). O método de Jukes e outros em Mammalian Protein Metabolism (Munro, ed., 1969), foi usado para calcular distâncias evolucionárias. A topologia foi reanalisada usando 1000 séries de dados de comando de entrada e os programas SEQBOOT, DNADIST e CONSENSE do pacote de PHYLIP de Felsenstein, *supra*.

6.1.12. Números de acesso de seqüência de nucleotídeo

A seqüência de gene de 16S rRNA determinada neste estudo é depositada com GenBank sob número de acesso AF181848. Os números de acesso e designações da referência de seqüências de gene de 16S rRNA usados nas análises filogenéticas são como segue: *Anaerobranca horikoshii* DSM 9786^T (U21809), *Caldicellulosiruptor saccarolyticus* ATCC 43494^T (L09178), *Caloramator coolhaasii* DSM 12679 AF104215, *Caloramator fervidus* ATCC 432045^T (L09187), *Caloramator indicus* ACM 3982^T (X75788), Caloramator proteoclasticus *DSM 10124^T* (X90488), *Clostridium butyricum* ATCC 19398^T (M59085), *Clostridium perfringens* ATCC 13124^T (M59103), *Moorella glycerini* DSM 11254^T (U82327), *Moorella thermoacetica* LJD^T (M59121), *Moorella thermoautotrophica* DSM 1974^T (L09168), *Oxobacter pfennigii* DSM 3222^T (X77838), *Thermoanaerobacter ethanolicus* ATCC 31550^T (L09162), *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* ATCC 3374^T (L09171), *Thermobrachium celere* DSM 8682 X99238, *Thermosyntropho lipolytica* DSM 11003^T (X99980).

6.2. Resultados

6.2.1. Enriquecimento e isolamento

O meio basal contendo glicerol foi inoculado com aprox. 10% (p/v) da amostra e incubado a 60°C. Em meio adicional da mesma composição exibindo pH 7,5 a pH 9,0 foi inoculado com a amostra (10% (p/v) cada). Somente a pH 6,0 um enriquecimento de cultura foi obtido que utilizou glicerol. Após transferências subsequentes (10% de p/v), séries de diluição deste enriquecimento de cultura foram preparados e colocadas em placas em meio basal sólido (1,5 % de agar) usando revestimentos de agar suaves, os quais consistiram de meio basal contendo 0,8 % de agar. Colônias simples foram colhidas, subcultivadas em meio líquido da mesma composição e formação de 1,3-propanodiol foi determinada por HPLC. Por formação de placas subsequentes, o procedimento foi repetido várias vezes usando meio basal bem como meio complexo definido descrito por Kell e outros, *Biochem. Biophys. Res. Commum.* 99:81-88 (1981). Crescimento em meio líquido foi amplamente acentuado quando as culturas foram incubadas sob agitação. Após

transferir colônias em meio basal líquido a 60°C sob agitação, uma cultura fermentando por glicerol foi obtida, a qual foi considerada como pura e foi designada como classe de JW/MS-VS5^T.

6.2.2. Morfologia de colônia e célula

Em placas contendo meio basal as colônias apareceram após 7-10 dias. Uma vez adaptadas para crescer em placas, vestígios subsequentes em placas frescas renderam colônias após 2-3 dias. As colônias eram uniformemente redondas, brancas e 1,0 a 1,5 mm em diâmetro. Células de classe de JW/MS-VS5^T eram bastões retos a ligeiramente curvados, 0,4 a 0,6 m em diâmetro e 2,0 a 3,0 m em comprimento. As células ocorrem na maior parte sozinhas. Nenhuma indicação de motilidade foi obtida usando microscopia luminosa. Análise de microscopia eletrônica desempenhada após formação de mancha negativa não revelou a presença de flagelo, usando células de diferentes estágios de crescimento. A ocorrência de esporos não foi observada a qualquer estágio de crescimento.

6.2.3. Reação de formação de Gram e tipo de Gram

As células mancharam Gram positivas somente na fase de crescimento exponencial. Seções ultrafinas de classe de JW/MS-VS5^T revelaram um peptidoglicano grosso, assim o organismo foi considerado como Gram tipo positivo Wiegel, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47:651-56 (1997). Esta disposição é consistente com o dado de sequenciamento de 16S rRNA o qual colocou o organismo no ramo de *Bacillus Clostridium*. Além disso ao peptidoglicano, outra camada mais externa foi observada, a qual poderia representar uma camada S, entretanto micrográficos de EM falharam em revelar quaisquer arranjos geométricos.

6.2.4. Limites de temperatura e pH

O limite de temperatura em pH^{25C} 6,0 para crescimento de JW/MS-VS5^T foi de 33 a 64°C com um ótimo a 58°C (Fig. 1). Nenhum crescimento foi detectado a 67°C ou a temperaturas menores do que 33°C. A classe cresceu em um limite de pH^{25C} de 5,0 a 7,8, com um ótimo a pH^{25C} 6,0-6,5 (Fig. 2). Nenhum crescimento foi detectado em pH^{25C} 8,0. O tempo de duplicação curto sob ótimas condições foi 2,8 h.

6.2.5. Utilização de substrato e produtos de fermentação

Os substratos utilizados incluíram glicerol, glicose, frutose, sacarose, celobiose, lactose, galactose, manose (20 mM), amido e extrato de levedura (5 g/l). JW/MS-VS5^T não usa xilose, arabinose, acetato, lactato, formato, metanol, etanol, n-propanol, i-propanol, n-butanol, propionato, acetona, sucinato, etileno glicol, 1,2-propanodiol, fenol, benzoato e H_2/CO_2.

Como mostrado em Tabela 1, fermentação de glicerol renderam acetato e 1,3-propanodiol como os produtos metabólicos orgânicos. Nenhum álcool C_1-C_3, diol outro além de 1,3-propranodiol ou outros ácidos orgânicos além de acetato foram detectados em quantidades mensuráveis. Quantidades significantes de H_2 foram produzidas nestas culturas.

A fermentação obtida sugere uma conversão de glicerol de acordo com a seguinte equação: 3 Glicerol → 2 1,3-Propanodiol + Acetato + CO_2 + H_2

6.2.6. Receptores de elétrons

Na presença de glicerol como um substrato, JW/MS-VS5^T não reduz nitrato (10 mM), óxido de Fe(III) amorfo (90 mM), ácido 9,10-antraquinona-2,6-disulfônico (AQDS), sulfato (10 mM), S◦ precipitado ou sublimado (30 mM). Produção de 1,3-propanodiol não foi efetuada na presença de qualquer um destes receptores de elétrons. Classe de JW/MS-VS5^T f não foi capaz de crescer com O_2 (20% v/v) na fase gasosa.

6.2.7. Suscetibilidade a antibiótico

Ampicilina, cloranfenicol, eritromicina, rifampicina, e canamicina inibiram completamente crescimento a uma concentração de 100 mg/ml de meio. Adição de estreptomicina e tetraciclina em uma mesma concentração resultou em retardamento de crescimento.

6.2.8. Composição de base de DNA

O conteúdo G+C do DNA genômico foi 32 % de mol (HLC).

6.2.9. Comparação de seqüência de gene 16S rRNA

Uma seqüência de gene 16S rRNA completa de JW/MS-VS5 compreendendo 1480 nucleotídeos em crescimento foi determinada. Duas séries de dados foram usadas para a análise filogenética. Série de dados um

continha a seqüência determinada neste estudo e uma seleção de seqüências de referência da bactéria de Gram positivo G+C enquanto série de dados dois continha a nova seqüência e as seqüências disponíveis nas bases de dados para as cinco espécies do gênero *Caloramator* e *Thermobrachium*. Análises filogenéticas baseadas em série de dados um compreendendo 1206 nucleotídeos não ambíguos entre posições 98 e 1469 (posições *E. coli*, Brosius e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:4801-4805 (1978)) mostraram o novo isolado para agrupar-se junto como linhagem distinta dentro da radiação do gênero previamente descrito *Caloramator* e *Thermobrachium* (Fig. 3). JW/MS-VS5 divide 91,7 a 94,1% de similaridade de seqüência de gene de 16S rRNA com espécies do gênero previamente descrito *Caloramator* e *Thermobrachium* e entre 83,4 a 87,1% de similaridade para as seqüências das outras taxas incluídas em série de dados um e mostradas em (Fig. 3). A segunda série de dados contendo as seqüências dos novos isolados e aqueles das cinco outras espécies de *Caloramator* e *Thermobrachium* e compreendendo 1393 nucleotídeos não ambíguos entre posições 38 e 1469 (posições *E. coli*, Brosius e outros, acima) foi usado para calcular valores de similaridade em modo de par entre a taxa deste grupo. As similaridades de seqüência de gene 16S rRNA entre classe JW/MS-VS5 e a taxa previamente descrita foram no limite de 91,3 A 93,7%. Dentro do grupo de *Caloramator/Thermobrachium* o valor de similaridade de seqüência mais alto (93,7%) foi encontrado entre classe JW/MS-VS5 e *Thermobrachium celere*. Análises de comando de entrada nos ramos recuperados em Figura 5 claramente dá suporte ao grupo de *Caloramator/Thermobrachium* e o relacionamento deste grupo ao gênero do grupo I de *Clostridium* como definido em Collins e outros, *Int. J. Swss P. Bacteriol.* 44:812-826 (1994).

Como é aparente da análise filogenética (Fig. 3), a classe é muito próxima relacionada *Thermobrachium celere* e três espécies de *Caloramator* que formam um grupo distinto dentro do ramo de *Bacillus-Clostridium* de Gram tipo positivo da árvore filogenética. Estas quatro espécies bactérias anaeróbias termofílicas quimioorganoheterotrófica exibindo um conteúdo inferior de G+C, o qual aplica para classe de JW/MS-VS5^{T}

como tal. Tabela 2 mostra uma comparação de traços morfológicos e fisiológicos das cinco espécies encontradas neste grupo.

Tabela 1. Fermentação de glicerol por classe de JW/MS-VS5^T

Substrato	Produto formado [mM]			Recuperação de Carbono [%]
Glicerol consumido [mM]	1,3-propanodiol	Acetato	H_2	
16,2	11,2	4,8	6,5	99

A concentração inicial de glicerol usada para cultivo de classe de JW/MS-VS5^T em meio basal foi 33 mM.

Tabela 2. Propriedades selecionadas de usados neste estudo: JW/MS-VS5^T, *Thermobrachium celere,* e espécies de *Caloramator C. fervidus, C. indicus,* e *C. proteoclasticus.*

Propriedade

Classe	Formação de Esporo	Limite de Temperatura	Temperatura Ótima	pH Ótimo	Utilização de glicerol	Tempo de duplicação mais curto [h]	conteúdo de G+C [% por mol]
JW/MS-VS5^T	-	≥33-≤64	58	6,0-6,5	+	2,80	32
*T celere**	-	>(37-45)-<(70-<80)	62-67	8,0-8,5	-	0,38	30-31
C. indicus	-	>37<80	60-65	8,1	NR	0,33	25
C. fervidus	+	>37-80	68	7,0-7,5	NR	0,75	39
C. proteoclasticus.	+	≤30-<58	55	7,0-7,5	NR	0,50	31

NR: não descrito

*: classes diferentes

7. EXEMPLO: Detecção de um gene como dhaB em JW/MS-VS5^T

7,1. Materiais e Métodos

JW/MS-VS5^T foi caracterizado por um método PCR usando o gene de *K. pneumoniae* dhaB como um controle positivo. Quatro séries foram usadas: (a) dhaB1, consistindo de dhaB15' GGA ATT CAG ATC TCA GCA ATG AAA AGA TCA AAA CG (NO de ID de SEQ:1) e dhaB13' GCT CTA GAT TAT TCA ATG GTG TCG GG (NO de ID de SEQ:2);

(b) dhaB2, consistindo de

dhaB25' GGA ATA CAG ATC TCA GCA ATG CAA CAG ACA ACC C (NO de ID de SEQ:3) e dhaB23' GCT CTA GAT CAC TCC CTT ACT AAG TCG (NO de ID de SEQ:4);

(c) dhaB3, consistindo de

dhaB35' GGA ATT CAG ATC TCA GCA ATG AGC GAG AAA ACC ATG C (NO de ID de SEQ:5) e dhaB33' GCT CTA GAT TAG CTT CCT TTA CGC AGC (NO de ID de SEQ:6); e

(d) dhaX, consistindo de

dhaX5' AGG TGG TGC GGA TCC TGT CGA ATC CCT A (NO de ID de SEQ:7) e dhaX3' GAT ACG AGA TCT TTA ATT CGC CTG ACC GGC CAG TAG CAG (NO de ID de SEQ:8). Todos os iniciadores foram adquiridos de GIBCO BRL. A reação PCR foi realizada em tubos Hot Start PCR (Molecular Bio-Products, Inc.) com 10 µl de reagentes de reação PCR. Cada 100 µl de reação PCR contém: 2µl de cultura de bactéria, 20µl de 1mMdNTPs, 10µl de 10X compensador de PCR (100mMKCL, 100mM de (NH4)2SO4, 200 mM Tris-HCl (pH 8,75), 20 mM MgSO4, Triton 1%, 1mg/ml de BSA)-[Strategene, La Jolla, CA], 3 ul de cada 2 séries de iniciador opositor (10 O. D./ul), e 1 ul de Pfu DNA Polimerase (2,5 U/ul) – [Strategene, La Jolla, CA.] Ampliações de PCR foram executadas em uma MiniCycler térmico automatizado (MJ Research) em três temperaturas de recozimento diferentes -para testar a melhor condição. A condição final é coo segue: Cinco ciclos iniciais de desnaturação (94C, 1,5 mm), recozimento de baixa severidade (37C, 1,5mm), e extensão (72C, 2,5 mm). Após ciclos iniciais. 25 ciclos adicionais em severidade de recozimento maior foram conduzidas: desnaturação (94C, 1,5 mm),

recozimento (55C, 1,5 mm), e extensão (72C, 2,5 mm). Dez µl de 10 X de tintura de carregamento de DNA foi adicionado a cada amostra e 15 µg de cada um dos produtos foram eletroforisados em um gel de agarose.

Resultados

O controle positivo proporciona as próprias faixas como esperado. O microorganismo apresentou tênues faixas de DNA com mesmo tamanho de dhaB 1 e Dhab3 mas não em dhaB2 e dhaX. As faixas tênues podem ser devido a baixa homologia de iniciadores de PCR e genes alvos. Estes resultados sugeriram que JW/MS-VS5^T pode abrigar um gene tipo dhaB o qual serve a mesma função ou similar como dhaB em *K. pneumoniae*.

EXEMPLOS: Determinação *In vitro* de atividade de JW/MS-VS5^T glicerol desidratase

Células tratadas com tolueno de classe de JW/MS-VS5^T foram testadas para a capacidade de converter glicerol a 3-hidroxipropionaldeído (3-HPA) e 1,2-propanodiol a proprionaldeído.

Material de Métodos

Células foram cultivadas anaerobiamente a 60°C em um meio de sais minerais suplementado com 0,5 g/l de extrato de levedura e 3g/l de glicerol, pH 6,8. Células foram colhidas anaerobiamente e armazenadas a -70°C sob nitrogênio.

Células congeladas foram descongeladas com tolueno em uma caixa de luva sob condições anaeróbias. Tratamento de tolueno consistiu das etapas seguintes: (a) lavar as células em 1 ml de 50 mM de KPO_4 pH 8,0; (b) rodar as células 6 minutos a 14.000 RPM em uma centrífuga de Eppendorf 5415C; (c) lavando as células em 1,5 ml de 50 mM de KPO_4 pH 8,0; (d) novamente rodar as células 6 minutos a 14000 RPM em uma centrífuga de Eppendorf 5415C; (e) redissolver as células em 2 ml de 50 mM de KPO_4 pH 8,0; (f) adicionar 20 µg de tolueno; (g) agitar vigorosamente por 15 minutos; (h) rodar as células 10 minutos a 14.000 RPM em uma centrífuga Eppendorf 5415C; (i) lavar as células em 2 ml de 50 mM de KPO_4 pH 8,0; (j) rodar as células 6 minutos a 14.000 RPM em uma centrífuga Eppendorf 5415C; (k) repetir etapas (i) e (j); redissolver as células tratadas com tolueno

em 50 mM de KPO_4 pH 8,0; (m) medir a absorbância das células dissolvidas a 60 nm; e (m) armazenar as células a -70°C.

Misturas de reação contida em 1,0 ml: 15 mM de kPO_4, pH 8,0; 0,25 M de KCl; 200 mM de glicerol ou 1,2-propanodiol; células tratadas de tolueno, 0,38 OD600; e 12 µM de coenzima B_{12}. Reações foram incubadas a 60°C anaerobiamente e amostras foram tomadas em vezes indicados em Figura 4. 100 µl de amostras foram adicionados a 50 µl de solução metil benzil tiazolinona hidrazona (MBTH) (6 mg/ml em 375 mM de glicina-HCl pH 2,7), aquecido a 100°C por 3 minutos, resfriado em gelo por 30 segundos, e clarificado por centrifugação a 14K RPM por 5 minutos.

Os sobrenadantes foram então analisados por detecção de produto em uma fase reversa de sistema HPLC como segue: (a) a coluna foi um 15 x 4,6 cm Supelco, Supelcosil LC-8-DB, 3 µM de tamanho de partícula; (b) solvente A foi 0,1% de TFA; (c) solvente B foi 90% de acetonitrila, 0,08% de TFA; (d) o gradiente foi (tempo[min.]/%B):0/0, 7/45, 17/65, 22/100, 24/100, 25/0, 30/0; (e) ejeção de volume foi 20 µl; (f) velocidade de arraste injetora foi 833,3 µl/min.; (g) detecção foi a 305 nm com uma referência de 500 nm, e (h) largura da faixa foi 4 para comprimento de onda da amostra e 80 para comprimento de onda da referência. Usando este sistema, o tempo de retenção para 3-HPA foi 8,7 min e para propionaldeído foi 10,7 min.

8.2. Resultados

Os cursos de tempo para a conversão de glicerol a 3-HPA e 1,2-propanodiol a propionaldeído a 60°C são mostrados em Figura 4. Os resultados indicam que glicerol desidratase é ativo a 60°C, a temperatura de crescimento do organismo. A enzima ;e inativada por glicerol, mas não 1,2-propanodiol. Inativação similar tem sido descrita na literatura por outra glicerol desidratase. Realmente, a glicerol desidratase de *Klebsiella* é inativa a 60°C.

9. BREVE DESCRIÇÃO DE DEPÓSITO BIOLÓGICO E LISTAGEM DE SEQÜÊNCIA

Classe de Tipo JW/MS-VS5^T de *C. viterbiensis* foi depositado em 27 de Agosto de 1999 com o ATCC sob os termos do Budapest Treaty on

the International Recognition of the Deposit of Micro-organisms for Purpose of Patent Procedure e é designado como ATCC PTA-584. "ATCC" refere-se ao depositório internacional de American Type Culture Colletion localizado no 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852 U.S.A. As designações referem-se ao número de acesso do material depositado.

A seqüência de 16S rRNA de classe de JW/MS-VS5^T foi depositada nos dados de base do Genbank sob número de acesso AF181848.

Equivalentes

A especificação escrita precedente é suficiente para permitir um perito na técnica praticar a invenção. Realmente, várias modificações dos meios descritos acima para realizar a invenção os quais são óbvios para aqueles peritos no campo de biologia molecular, biotecnologia e campos relacionados são pretendidos a estarem dentro do objetivo das seguintes reivindicações.

REIVINDICAÇÕES

1. Método de converter glicerol a 1,3-propanodiol em *Caloramator viterbiensis*, caracterizado pelo fato de que compreende:

cultivar *Caloramator viterbiensis* que fermenta glicerol a 1,3-propanodiol sob condições que 1,3-propanodiol seja produzido; em que a *Caloramator viterbiensis* é o organismo depositado sob número de acesso ATCC PTA-584;

em que a *Caloramator viterbiensis* é cultivada em uma temperatura de 33 °C a cerca de 64 °C e em um pH de 5,0 a cerca de 7,6.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a *Caloramator viterbiensis* é cultivada em um pH entre 6,0 e 6,5.

3. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a *Caloramator viterbiensis* é cultivada em uma temperatura entre 50 °C e 64 °C.

4. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a *Caloramator viterbiensis* é cultivada em uma temperatura entre 57 °C e 64 °C.

5. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a *Caloramator viterbiensis* é cultivada em um pH de 6,0 e uma temperatura de 58 °C.

6. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a *Caloramator viterbiensis* é cultivada sob condições anaeróbias.

7. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a *Caloramator viterbiensis* é cultivada sob nitrogênio.

8. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a *Caloramator viterbiensis* é cultivada sob argônio.

9. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a *Caloramator viterbiensis* é cultivada sob uma mistura de nitrogênio e dióxido de carbono em um razão de nitrogênio para dióxido de carbono de 80 para 20.

10. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a *Caloramator viterbiensis* é cultivada na presença de um remo-

vedor de oxigênio.

11. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a *Caloramator viterbiensis* é cultivada em uma câmara anaeróbia.

12. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a *Caloramator viterbiensis* é cultivada sob condições microaeróbias.

13. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a *Caloramator viterbiensis* é adsorvida em um suporte sólido.

14. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a *Caloramator viterbiensis* é cultivada sob condições aeróbias.

15. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende cultivar a referida cepa de *Caloramator viterbiensis* em uma temperatura entre 33 e 64 °C e o pH do meio sendo mantido entre 6,0 e 6,5, de forma que 1,3-propanodiol seja produzido.

16. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende cultivar a referida cepa de *Caloramator viterbiensis* em uma temperatura entre 50 e 64 °C e o pH do meio sendo mantido entre 6,0 e 6,5, de forma que 1,3-propanodiol seja produzido.

17. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende cultivar a referida cepa de *Caloramator viterbiensis* em uma temperatura entre 57 e 64 °C e o pH do meio sendo mantido entre 6,0 e 6,5, de forma que 1,3-propanodiol seja produzido.

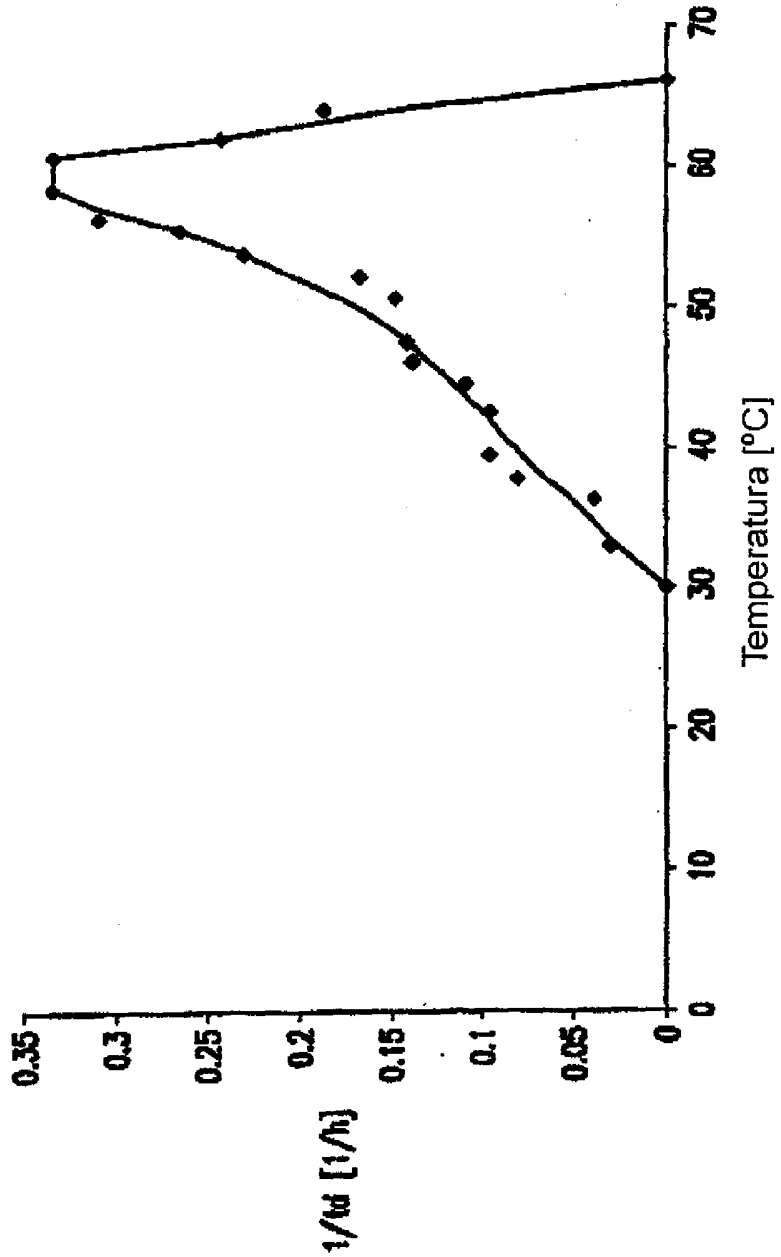

0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
1/td [1/h]
0
10
20
30
40
50
60
70
Temperatura [ºC]

FIG.1

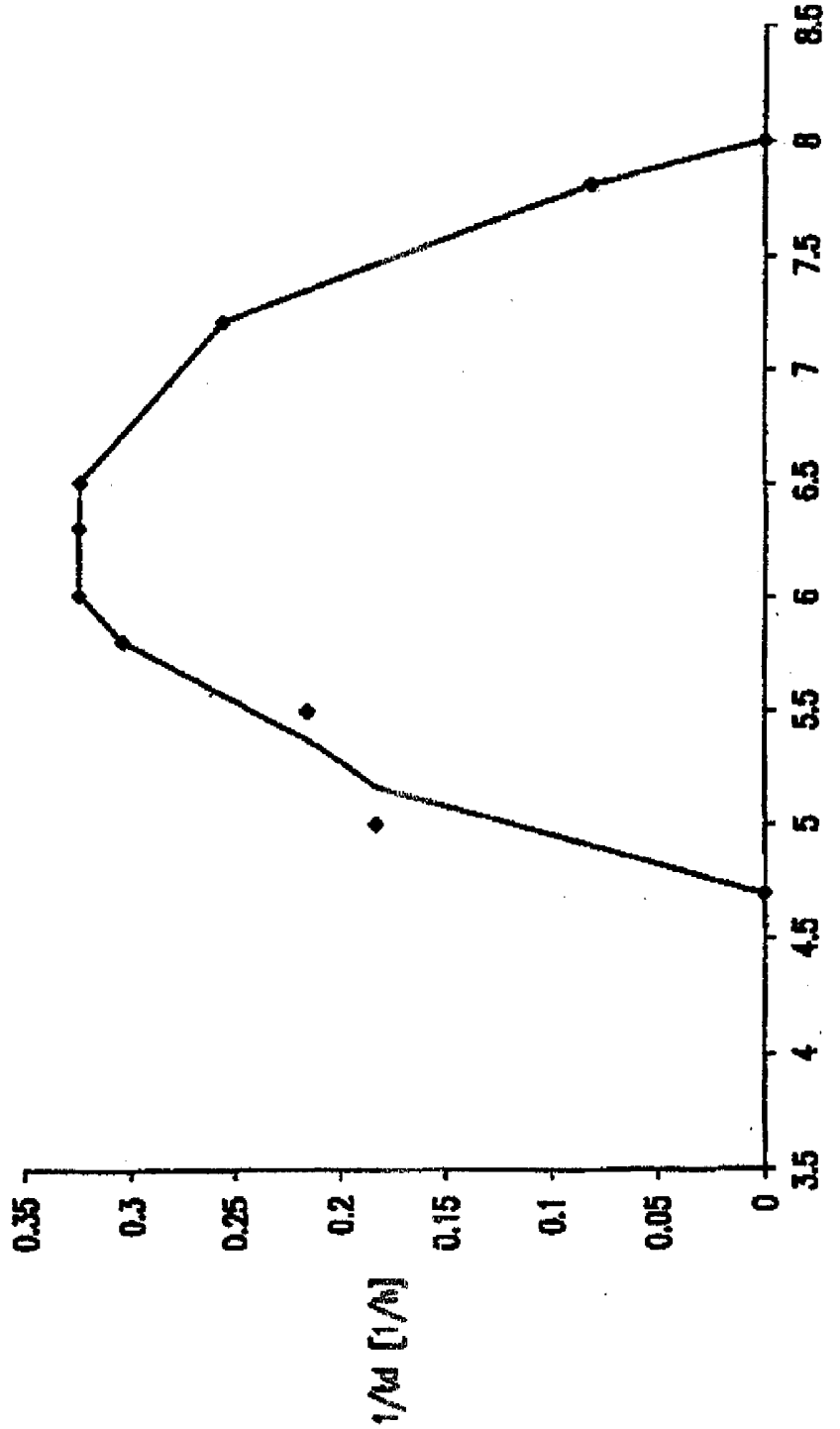


FIG.2

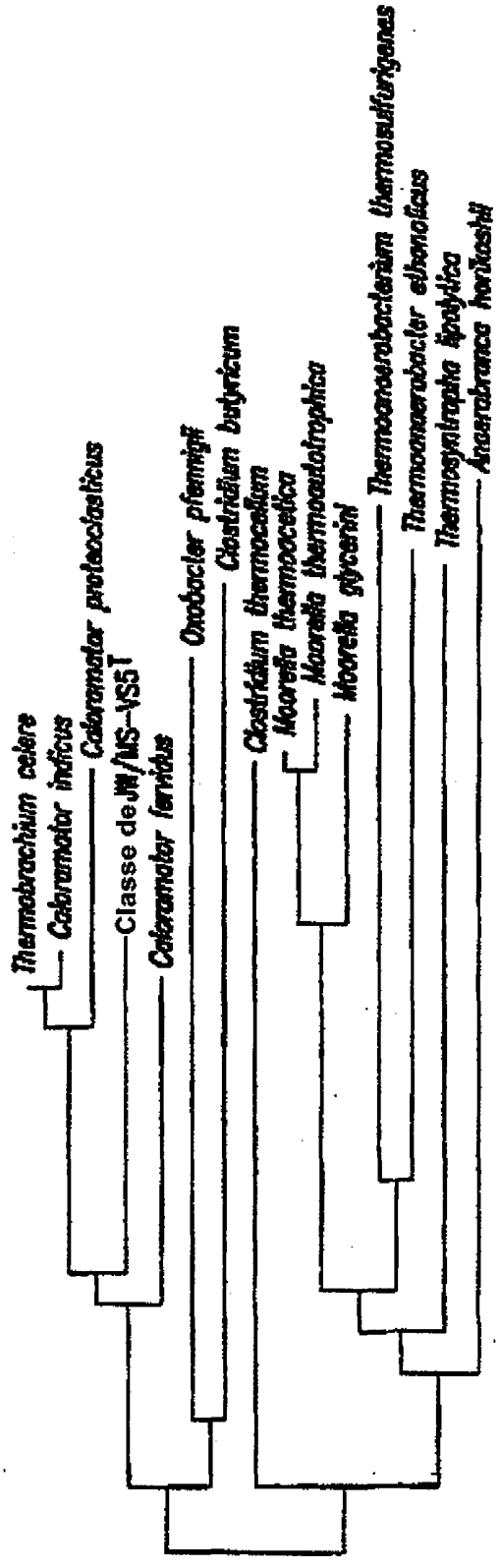

Thermobrachium celere
Caloramator indicus
Caloramator proteoclasticus
Classe de JW/NS-YS5T
Caloramator fervidus
Ovobacter pfennigii
Clostridium butyricum
Clostridium thermocellum
Moorella thermoacetica
Moorella thermoautotrophica
Moorella glycerini
Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes
Thermoanaerobacter ethanolicus
Thermosyntropha lipolytica
Anaerobranca horikoshii
5.0%

FIG.3

Ensaio de curso de tempo para a conversão de glicerol a 3- HPA por células JW / MS - VS - 5 toluenizadas anaerobiamente a 60 ºC sob condições anaeróbias

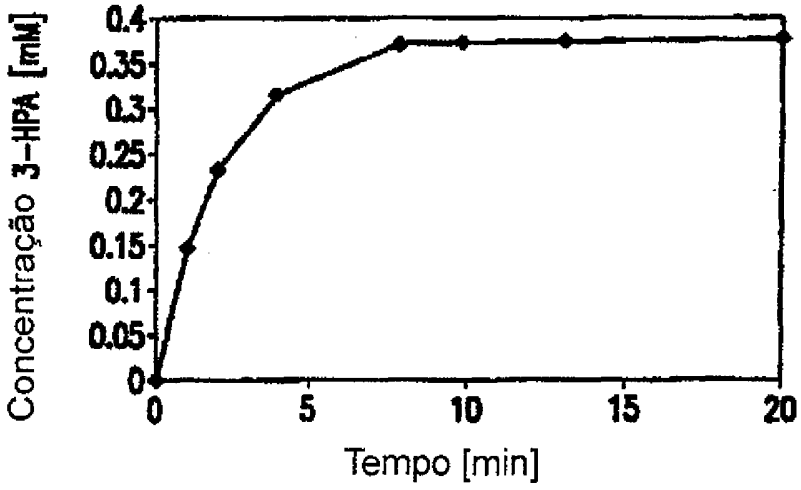


FIG.4

Ensaio de curso de tempo para a conversão de 1,2 - propanodiol a propionaldeído por células JW / MS - VS - 5 toluenizadas anaerobiamente a 60 °C sob condições anaeróbias

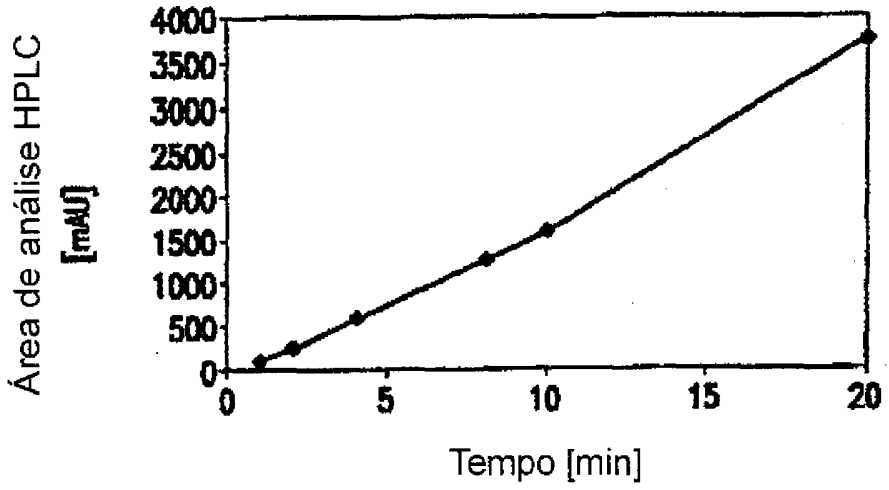


FIG.5

RESUMO

Patente de Invenção: **"MÉTODO DE CONVERTER GLICEROL A 1,3-PROPANODIOL EM *CALORAMATOR VITERBIENSIS*".**

A presente invenção refere-se a métodos e reagentes aperfeiçoados para a produção de 1,3-propanodiol. Em particular, a presente invenção fornece novos organismos termofílicos e enzimas termoestáveis capazes de catalisar a fermentação de glicerol a 1,3-propanodiol. A presente invenção também refere-se a métodos de isolar tais organismos termofílicos, métodos de clonar polinucleotídeos que codificam tais enzimas, polinucleotídeos codificando tais enzimas, e métodos de usar tais enzimas e organismos para a produção de 1,3-propanodiol.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas de que trata a Resolução INPI 228 de 11/11/2009:

Código de Controle

Campo 1



F1A577A213CCE371

Campo 2



7747139FFF62640A

Outras Informações:

- Nome do Arquivo: p115269 8747108_1.TXT
- Data de Geração do Código: 14-09-2010
- Hora de Geração do Código: 09:39:56
- Código de Controle:
    - Campo 1: F1A577A213CCE371
    - Campo 2: 7747139FFF62640A