



(21) BR 112019015458-2 A2



* B R 1 1 2 0 1 9 0 1 5 4 5 8 A 2 *

(22) Data do Depósito: 26/01/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 31/03/2020

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

(54) Título: MICRORGANISMO GENETICAMENTE OTIMIZADO PARA PRODUZIR MOLÉCULAS DE INTERESSE

(51) Int. Cl.: C12N 1/13; C12N 1/15; C12N 1/19; C12N 1/21; C12N 15/52; (...).

(30) Prioridade Unionista: 27/01/2017 FR 1750694.

(71) Depositante(es): ENOBRAQ.

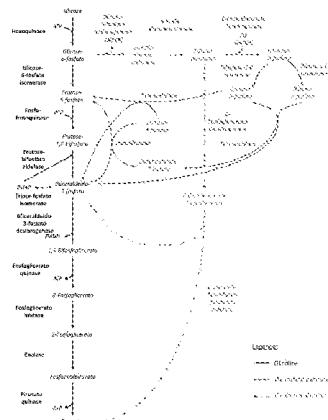
(72) Inventor(es): CÉDRIC BOISART; NICOLAS MORIN.

(86) Pedido PCT: PCT EP2018052005 de 26/01/2018

(87) Publicação PCT: WO 2018/138289 de 02/08/2018

(85) Data da Fase Nacional: 26/07/2019

(57) Resumo: A invenção se refere a um microrganismo geneticamente modificado expressando uma enzima RuBisCO funcional do tipo I ou II e uma fosforibuloquinase funcional (PRK), e na qual a via da glicólise é pelo menos parcialmente inibida, o referido microrganismo sendo geneticamente modificado de forma a produzir uma molécula exógena e/ou superproduzir uma molécula endógena. De acordo com a invenção, a ramificação oxidativa da via das fosfato pentoses pode também ser pelo menos parcialmente inibida. A invenção também diz respeito ao uso de tal microrganismo geneticamente modificado para a produção ou superprodução de uma molécula de interesse e processos para a síntese ou bioconversão de moléculas de interesse.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para:
"MICRORGANISMO GENETICAMENTE OTIMIZADO PARA PRODUZIR MOLÉCULAS DE INTERESSE"

Campo da Invenção

[001] A invenção se refere a um microrganismo geneticamente modificado, capaz de usar dióxido de carbono como uma fonte de carbono pelo menos parcial, para a produção de moléculas de interesse. Mais especificamente, a invenção se refere a um microrganismo no qual pelo menos a via da glicólise é pelo menos parcialmente inibida. A invenção também se refere a processos para a produção de pelo menos uma molécula de interesse usando tal microrganismo.

Estado da Técnica

[002] Nos últimos anos, vários processos microbiológicos foram desenvolvidos para permitir a produção de moléculas de interesse em grandes quantidades.

[003] Por exemplo, processos de fermentação são usados para produzir moléculas por um microrganismo a partir de uma fonte de carbono fermentável, tal como a glicose.

[004] Processos de bioconversão também foram desenvolvidos para permitir que um microrganismo converta um co-substrato, não assimilável pelo referido microrganismo, em uma molécula de interesse. Aqui, novamente, é necessária uma fonte de carbono, não para a produção real da molécula de interesse, mas para a produção de cofatores, e mais

particularmente de NADPH, que podem ser necessários para a bioconversão. Em geral, o rendimento de produção de tais processos microbiológicos é baixo, principalmente devido à necessidade de cofatores e à dificuldade de balancear reações metabólicas redox. Há também o problema do preço de custo de tais moléculas, uma vez que uma fonte de carbono assimilável pelo microrganismo ainda é necessária. Em outras palavras, atualmente, para produzir uma molécula de interesse com um processo microbiológico, é necessário fornecer uma molécula (glicose, ou outra), certamente de menor valor industrial, mas que é suficiente para fazer a produção de certas moléculas não economicamente atrativas.

[005] Ao mesmo tempo, o dióxido de carbono (CO_2), cujas emissões para a atmosfera aumentam constantemente, é pouco usado nos atuais processos microbiológicos, enquanto o consumo de microrganismos para a produção de moléculas de interesse não só reduz os custos de produção, mas também aborda certas questões ecológicas.

[006] Por conseguinte, existe ainda a necessidade de processos microbiológicos para permitir a produção de moléculas de interesse em grandes quantidades e com preços de custo mais baixos do que com os processos atuais.

Sumário da Invenção

[007] A vantagem de utilizar microrganismos não fotossintéticos geneticamente modificados para capturar CO_2

e utilizá-lo como principal fonte de carbono, da mesma forma que plantas e microrganismos fotossintéticos, já foi demonstrada. Por exemplo, microrganismos modificados para expressar um RuBisCO funcional (ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase - EC 4.1.1.39) e um PRK funcional (fosforibuloquinase - EC 2.7.1.19) para reproduzir um ciclo de Calvin parcial e converter a ribulose-5-fosfato em duas moléculas de 3-fosfoglicerato através da captura de uma molécula de dióxido de carbono.

[008] Trabalhando com as soluções fornecidas pelo ciclo de Calvin para produzir moléculas de interesse usando CO₂ como fonte de carbono, os inventores descobriram que é possível aumentar o rendimento de produção de moléculas de interesse, acoplando parte do ciclo de Calvin (PRK/RuBisCO) a pelo menos inibição parcial da glicólise. Os inventores também descobriram que é possível aumentar o consumo de CO₂ exógeno durante a produção de moléculas de interesse, inibindo também pelo menos parcialmente a ramificação oxidativa da via das pentose-fosfato. Os microrganismos assim desenvolvidos permitem produzir em larga escala e com um rendimento industrial atrativo, um grande número de moléculas de interesse, tais como aminoácidos, ácidos orgânicos, terpenos, terpenóides, peptídeos, ácidos graxos, polióis etc.

[009] A invenção se refere assim a um microrganismo

geneticamente modificado que expressa uma enzima RuBisCO funcional e uma fosforibuloquinase funcional (PRK), e em que a via de glicólise é pelo menos parcialmente inibida, o referido microrganismo a ser geneticamente modificado de modo a produzir uma molécula exógena de interesse e/ou a superproduzir uma molécula endógena de interesse, que não seja uma enzima RuBisCO ou fosforibuloquinase.

[0010] Em uma modalidade particular, o microrganismo geneticamente modificado tem uma ramificação oxidativa da via das pentoses-fosfato que também é pelo menos parcialmente inibida.

[0011] A invenção também se refere ao uso de um microrganismo geneticamente modificado de acordo com a invenção, para a produção ou superprodução de uma molécula de interesse, preferencialmente selecionada a partir de aminoácidos, peptídeos, proteínas, vitaminas, esteróis, flavonóides, terpenos, terpenóides, ácidos graxos, polióis e ácidos orgânicos.

[0012] A presente invenção também se refere a um processo biotecnológico para produção ou superprodução de pelo menos uma molécula de interesse, caracterizado por compreender uma etapa de cultivo de um microrganismo geneticamente modificado de acordo com a invenção, sob condições que permitem a síntese ou bioconversão, pelo referido microrganismo, da referida molécula de interesse e,

opcionalmente, uma etapa de recuperação e/ou purificação da referida molécula de interesse.

[0013] Também diz respeito a um processo para produzir uma molécula de interesse compreendendo (i) inserir pelo menos uma sequência codificando uma enzima envolvida na síntese ou bioconversão da referida molécula de interesse em um microrganismo recombinante de acordo com a invenção, (ii) cultivar o referido microrganismo sob condições que permitem a expressão da referida enzima e opcionalmente (iii) recuperar e/ou purificar a referida molécula de interesse.

Descrição das Figuras

[0014] Figura 1: Diagrama geral da glicólise, a via das pentose-fosfato e a via de Entner-Doudoroff;

[0015] Figura 2: Representação esquemática da inibição da via da glicólise, de acordo com a invenção;

[0016] Figura 3: Representação esquemática da inibição da via da glicólise, combinada com a inibição da ramificação oxidativa da via das pentose-fosfato, de acordo com a invenção.

Descrição Detalhada da Invenção

[0017] *Definições*

[0018] Os termos “*microrganismo recombinante*”, “*microrganismo modificado*” e “*célula hospedeira recombinante*” são usados aqui de forma intercambiável e se referem a microrganismos que foram geneticamente modificados

para expressar ou superexpressar sequências nucleotídicas endógenas, expressar sequências nucleotídicas heterólogas, ou que possuem uma expressão alterada de um gene endógeno. "Alteração" significa que a expressão do gene, ou nível de uma molécula de RNA ou de moléculas de RNA equivalentes codificando uma ou mais polipeptídeos ou subunidades polipeptídicas, ou a atividade de um ou mais polipeptídeos ou subunidades polipeptídicas é regulada, de modo que a expressão, o nível ou a atividade é maior ou menor do que a observada na ausência de modificação.

[0019] É entendido que os termos "*microrganismo recombinante*", "*microrganismo modificado*" e "*célula hospedeira recombinante*" se referem não apenas ao microrganismo recombinante particular, mas à progenitura ou o potencial da prole de tal microrganismo. Como algumas modificações podem ocorrer nas gerações subsequentes, devido à mutação ou influências ambientais, esses descendentes podem não ser idênticos à célula-mãe, mas eles ainda são compreendidos dentro do escopo do termo, conforme usados aqui.

[0020] No contexto da invenção, uma via metabólica pelo menos parcialmente "*inibida*" ou "*inativada*" se refere a uma via metabólica alterada que não pode mais funcionar adequadamente no microrganismo considerado, em comparação com o mesmo microrganismo do tipo selvagem (não modificado

geneticamente para inibir a referida via metabólica). Em particular, a via metabólica pode ser interrompida, levando ao acúmulo de um metabólito intermediário. Tal interrupção pode ser conseguida, por exemplo, inibindo a enzima necessária para a degradação de um metabolito intermediário da via metabólica considerada e/ou inibindo a expressão do gene que codifica aquela enzima. A via metabólica também pode ser atenuada, isto é, desacelerada. Tal atenuação pode ser conseguida, por exemplo, inibindo parcialmente uma ou mais enzimas envolvidas na via metabólica considerada e/ou inibindo parcialmente a expressão de um gene que codifica pelo menos uma destas enzimas e/ou explorando os cofatores requeridos para certas reações. A expressão “via metabólica pelo menos parcialmente inibida” significa que o nível da via metabólica considerada é reduzido em pelo menos 20%, mais preferencialmente em pelo menos 30%, 40%, 50% ou mais, em comparação com o nível em um microrganismo do tipo selvagem. A redução pode ser maior e, em particular, pode ser pelo menos superior a 60%, 70%, 80%, 90%. De acordo com a invenção, a inibição pode ser total, no sentido de que a via metabólica considerada não é mais utilizada de todo pelo referido microrganismo. De acordo com a invenção, tal inibição pode ser temporária ou permanente.

[0021] De acordo com a invenção, “inibição da expressão gênica” significa que o gene não é mais expresso

no microrganismo considerado ou que sua expressão é reduzida, comparado com microrganismos do tipo selvagem (não geneticamente modificados para inibir a expressão gênica), levando à ausência de produção da proteína correspondente ou a um decréscimo significativo na sua produção e, em particular, a um decréscimo superior a 20%, mais preferencialmente 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%. Em uma modalidade, a inibição pode ser total, isto é, a proteína codificada pelo referido gene não é mais produzida de todo. A inibição da expressão gênica pode ser conseguida por deleção, mutação, inserção e/ou substituição de um ou mais nucleotídeos no gene considerado. Preferencialmente, a inibição da expressão do gene é conseguida por deleção total da sequência nucleotídica correspondente. De acordo com a invenção, qualquer método de inibição de genes, conhecido per se pelo especialista e aplicável a um microrganismo, pode ser usado. Por exemplo, a inibição da expressão gênica pode ser conseguida por recombinação homóloga (Datsenko et al., Proc Natl Acad Sci. U.S.A. 2000; 97: 6640-5; Lodish et al., Molecular Cell Biology 4a ed. 2000. W. H. Freeman e Companhia, ISBN 0-7167-3136-3); mutagênese aleatória ou direcionada para modificar a expressão do gene e/ou a atividade da proteína codificada (Thomas et al, Cell 1987; 51: 503-12); modificação de uma sequência promotora do gene para alterar a sua expressão (Kaufmann et al, Methods Mol

Biol 2011; 765: 275-94 doi: 10.1007/978-1-61779-197-0_16); direcionamento de lesões locais induzidas em genomas (TILLING); conjugação etc. Outra abordagem particular é a inativação de genes por inserção de uma sequência estranha, por exemplo, por mutagênese por transposons utilizando elementos genéticos móveis (transposons), de origem natural ou artificial. De acordo com outra modalidade preferida, a inibição da expressão gênica é conseguida por técnicas de knock-out. A inibição da expressão gênica também pode ser alcançada extinguindo o gene usando RNA interferente, ribozima ou RNA antissentido (Daneholt, 2006. Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina). No contexto da presente invenção, o termo "RNA interferente" ou "RNAi" se refere a qualquer molécula de RNAi (por exemplo, RNA de cadeia simples ou RNA de cadeia dupla) que pode bloquear a expressão de um gene alvo e/ou facilitar a degradação do mRNA correspondente. A inibição gênica também pode ser obtida por métodos de edição de genoma que permitem a modificação genética direta de um dado genoma, através do uso de nucleases de dedos de zinco (Kim et al., PNAS; 93: 1156-1160), nucleases efetoras semelhantes a ativadores da transcrição, ou "TALEN" (Ousterout et al., Methods Mol Biol. 2016; 1338: 27-42. doi: 10.1007/978-1-4939-2932-0_3), um sistema que combina nucleases Cas9 com repetições palindrômicas curtas com intervalos regulares, ou "CRISPR" (Mali et al., Nat Methods.

2013 Oct; 10 (10): 957-63. doi: 10.1038/nmeth.2649), ou meganucleases (Daboussi et al., Nucleic Acids Res. 2012 40: 6367-79). A inibição da expressão gênica também pode ser obtida através da inativação da proteína codificada pelo referido gene.

[0022] No contexto da invenção, a biossíntese ou bioconversão “dependente de NADPH” ou “consumidora de NADPH” significa que todas as vias de biossíntese ou bioconversão nas quais uma ou mais enzimas requerem o fornecimento concomitante de elétrons obtidos pela oxidação de um cofator de NADPH. As vias de biossíntese ou bioconversão “dependente de NADPH” se referem nomeadamente à síntese de aminoácidos (por exemplo, arginina, lisina, metionina, treonina, prolina, glutamato, homosserina, isoleucina, valina) ácido γ -aminobutírico, terpenóides e terpenos (por exemplo, farneseno), vitaminas e precursores (por exemplo, pantoato, pantotenato, transneurosporeno, filoquinona, tocoferóis), esteróis (por exemplo, esqualeno, colesterol, testosterona, progesterona, cortisona), flavonóides (por exemplo, frambinona, vestinona), ácidos orgânicos (por exemplo, ácido cítrico, ácido succínico, ácido oxálico, ácido itacônico, ácido cumárico, ácido 3-hidroxipropiônico), polióis (por exemplo, sorbitol, xilitol, glicerol), poliaminas (por exemplo, espermidina), moléculas aromáticas de hidroxilação estereoespecífica, através de um citocromo p450 dependente

de NADP (por exemplo, fenilpropanóides, terpenos, lipídios, taninos, fragrâncias, hormônios).

[0023] O termo "exógeno" como usado aqui em referência a várias moléculas (sequências de nucleotídeos, peptídeos, enzimas etc.) se refere a moléculas que não são normalmente ou naturalmente encontradas em e/ou produzidas pelo microrganismo considerado. Por outro lado, o termo "endógeno" ou "nativo" se refere a várias moléculas (sequências de nucleotídeos, peptídeos, enzimas etc.), designando moléculas que são normalmente ou naturalmente encontradas em e/ou produzidas pelo microrganismo considerado.

Microrganismos

[0024] A invenção propõe microrganismos geneticamente modificados para a produção de uma molécula de interesse, endógena ou exógena.

[0025] Microrganismo "*geneticamente modificado*" significa que o genoma do microrganismo foi modificado para incorporar uma sequência nucleica que codifica uma enzima envolvida na via de biossíntese ou bioconversão de uma molécula de interesse, ou que codifica um fragmento biologicamente ativo do mesmo. A referida sequência nucleica pode ter sido introduzida no genoma do referido microrganismo ou de um dos seus ancestrais, por qualquer método de clonagem molecular adequado. No contexto da invenção, o genoma do

microrganismo se refere a todo o material genético contido no microrganismo, incluindo material genético extracromossômico contido, por exemplo, em plasmídeos, epíssomas, cromossomos sintéticos etc. A sequência nucleica introduzida pode ser uma sequência heteróloga, isto é, uma que não existe naturalmente no referido microrganismo, ou uma sequência homóloga. Vantajosamente, uma unidade de transcrição com a sequência nucleica de interesse é introduzida no genoma do microrganismo, sob o controle de um ou mais promotores. Tal unidade de transcrição também inclui, vantajosamente, as sequências usuais, tais como terminadores de transcrição e, se necessário, outros elementos reguladores da transcrição.

[0026] Promotores utilizáveis na presente invenção incluem promotores constitutivos, isto é, promotores que são ativos na maioria dos estados celulares e condições ambientais, bem como promotores induzíveis que são ativados ou suprimidos por estímulos físicos ou químicos exógenos e, portanto, induzem um estado variável de expressão dependendo a presença ou ausência desses estímulos. Por exemplo, quando o microrganismo é uma levedura, é possível usar um promotor constitutivo, tal como o de um gene entre TEF1, TDH3, PGI1, PGK, ADH1. Exemplos de promotores induzíveis que podem ser utilizados em levedura são teto-2, GAL10, GAL10-CYC1, PHO5.

[0027] Em geral, o microrganismo geneticamente

modificado de acordo com a invenção tem as seguintes características:

- Expressão de um RuBisCO funcional (EC 4.1.1.39);
- Expressão de um PRK funcional (CE 2.7.1.19);
- Pelo menos inibição parcial da glicólise; e
- Expressão de pelo menos um gene envolvido na síntese e/ou bioconversão de uma molécula de interesse e/ou na inibição de pelo menos um gene que codifica a atividade competindo com a síntese e/ou bioconversão de uma molécula de interesse.

[0028] De acordo com a invenção, qualquer microrganismo pode ser usado. Preferencialmente, o microrganismo é uma célula eucariótica, preferencialmente selecionada de leveduras, fungos, microalgas ou uma célula procariótica, preferencialmente uma bactéria ou cianobactéria.

[0029] Em uma modalidade, o microrganismo geneticamente modificado de acordo com a invenção é uma levedura, preferencialmente selecionado a partir de entre os ascomicetos (*Spermophthoraceae* e *Saccharomycetaceae*), basidiomicetos (*Leucosporidium*, *Rhodosporidium*, *Sporidiobolus*, *Filobasidium* e *Filobasidiella*) e leveduras deuteromicetos pertencentes a *Fungi imperfecti* (*Sporobolomycetaceae* e *Cryptococcaceae*). Preferencialmente, a levedura geneticamente modificada de acordo com a invenção

pertence ao gênero *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Candida*, *Lipomyces*, *Rhodotorula*, *Rhodosporidium*, *Yarrowia* ou *Debaryomyces*. Mais preferencialmente, a levedura geneticamente modificada de acordo com a invenção é selecionada de *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis*, *Saccharomyces oviflisis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodosporidium toruloides*, *Yarrowia lipolytica*, *Debaryomyces hansenii* e *Lipomyces starkeyi*.

[0030] Em outra modalidade, o microrganismo geneticamente modificado de acordo com a invenção é um fungo, e mais particularmente um fungo "filamentoso". No contexto da invenção, "fungos filamentosos" se refere a todas as formas filamentosas da subdivisão *Eumycotina*. Por exemplo, o fungo geneticamente modificado de acordo com a invenção pertence ao gênero *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Neurospora*, *Podospora*, *Endotia*, *Mucor*, *Cochliobolus* ou *Pyricularia*. Preferencialmente, o fungo geneticamente modificado de acordo com a invenção é selecionado a partir de *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus awomari*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus terreus*, *Neurospora crassa*,

Trichoderma reesei e *Trichoderma viride*.

[0031] Em outra modalidade, o microrganismo geneticamente modificado de acordo com a invenção é uma microalga. No contexto da invenção, "microalga" se refere a todas as algas microscópicas eucarióticas, preferencialmente pertencentes às classes ou superclasses Chlorophyceae, Chrysophyceae, Prymnesiophyceae, Diatomae ou Bacillariophyta, Euglenophyceae, Rhodophyceae ou Trebouxiophyceae. Preferencialmente, as microalgas geneticamente modificadas de acordo com a invenção são selecionadas de *Nannochloropsis* sp. (por exemplo, *Nannochloropsis oculata*, *Nannochloropsis gaditana*, *Nannochloropsis salina*), *Tetraselmis* sp. (por exemplo, *Tetraselmis suecica*, *Tetraselmis chuii*), *Chlorella* sp. (por exemplo, *Chlorella salina*, *Chlorella protothecoides*, *Chlorella ellipsoidea*, *Chlorella emersonii*, *Chlorella minutissima*, *Chlorella pyrenoidosa*, *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella vulgaris*), *Chlamydomonas* sp. (por exemplo, *Chlamydomonas reinhardtii*) *Dunaliella* sp. (por exemplo, *Dunaliella tertiolecta*, *Dunaliella salina*), *Phaeodactylum tricornutum*, *Botryococcus braunii*, *Chroomonas salina*, *Cyclotella cryptica*, *Cyclotella* sp., *Ettlia texensis*, *Euglena gracilis*, *Gymnodinium nelsoni*, *Haematococcus pluvialis*, *Isochrysis galbana*, *Monoraphidium minutum*, *Monoraphidium* sp, *Neocloro oleoabundans*, *Nitzschia laevis*,

Onoraphidium sp., *Pavlova lutheri*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Porphyridium cruentum*, *Scenedesmus* sp. (por exemplo, *Scenedesmus obliquus*, *Scenedesmus quadricaula*, *Scenedesmus* sp.), *Stichococcus bacillaris*, *Spirulina platensis*, *Thalassiosira* sp.

[0032] Em uma modalidade, o microrganismo geneticamente modificado de acordo com a invenção é uma bactéria, de preferência selecionada de entre os filos Acidobacteria, Actinobacteria, Aquificae, Bacteroidetes, Chlamydia, Chlorobi, Chloroflexi, Chrysiogenetes, Cianobactérias, Deferrribacteres, Deinococcus-Thermus, Dictyoglomi, Fibrobacteres, Firmicutes, Fusobacteria, Gemmatimonadetes, Nitrospirae, Planctomycetes, Proteobacteria, Spirochaetes, Thermodesulfobacteria, Thermomicrobia, Thermotogae ou Verrucomicrobia. De preferência, a bactéria geneticamente modificada de acordo com a invenção pertence ao gênero *Acaryochloris*, *Acetobacter*, *Actinobacillus*, *Agrobacterium*, *Alicyclobacillus*, *Anabaena*, *Anacystis*, *Anaerobiospirillum*, *Aquifex*, *Arthrobacter*, *Arthrospira*, *Azobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Burkholderia*, *Chlorobium*, *Chromatium*, *Chlorobaculum*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Cupriavidus*, *Cyanothece*, *Enterobacter*, *Deinococcus*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Geobacter*, *Gloeobacter*, *Gluconobacter*, *Hydrogenobacter*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Mannheimia*,

Mesorhizobium, *Methylobacterium*, *Microbacterium*,
Microcystis, *Nitrobacter*, *Nitrosomonas*, *Nitrospina*,
Nitrospira, *Nostoc*, *Phormidium*, *Prochlorococcus*,
Pseudomonas, *Ralstonia*, *Rhizobium*, *Rhodobacter*, *Rhodococcus*,
Rhodopseudomonas, *Rhodospirillum*, *Salmonella*, *Scenedesmus*,
Serratia, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Streptomyces*,
Synechoccus, *Synechocystis*, *Thermosynechococcus*,
Trichodesmium ou *Zymomonas*. Também preferencialmente, a
 bactéria geneticamente modificada de acordo com a invenção
 é selecionada da espécie *Agrobacterium tumefaciens*,
succiniciproducens *Anaerobiospirillum*, *succinogenes*
actinomycetemcomitans, *Aquifex aeolicus*, *Aquifex pyrophilus*,
Bacillus subtilis, *Bacillus amyloliquefaciens*, *ammoniagenes*
Brevibacterium, *Brevibacterium immariophilum*, *Clostridium*
pasteurianum, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium*
acetobutylicum, *Clostridium beigerinckii*, *Corynebacterium*
glutamicum, *Cupriavidus necator*, *Cupriavidus metallidurans*,
Enterobacter sakazakii, *Escherichia coli*, *Gluconobacter*
oxydans, *Hydrogenobacter thermophilus*, *Klebsiella oxytoca*,
Lactococcus lactis, *Lactobacillus plantarum*,
succiniciproducens *Mannheimia*, *Mesorhizobium loti*,
Pseudomonas aeruginosa, *Pseudomonas mevalonii*, *Pseudomonas*
pudica, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*,
Rhizobium etli, *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodobacter*
sphaeroides, *Rhodospirillum rubrum*, *Salmonella enterica*,

Salmonella enterica, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Streptomyces coelicolor*, *Zymomonas mobilis*, *Acaryochloris marina*, *Anabaena variabilis*, *Arthospira platensis*, *Arthospira maxa*, *Chlorobium tepidum*, *Chlorobaculum sp.*, *Cyanothece sp.*, *Gloeobacter violaceus*, *Microcystis aeruginosa*, *Nostoc punctiforme*, *Prochlorococcus marinus*, *Synechococcus elongatus*, *Synechocystis sp.*, *Thermosynechococcus elongatus*, *Trichodesmium erythraeum* e *Rhodopseudomonas palustris*.

Expressão de um RuBisCO funcional e um PRK funcional

[0033] De acordo com a invenção, o microrganismo pode expressar naturalmente um RuBisCO funcional e um PRK funcional. Este é o caso, por exemplo, de microrganismos fotossintéticos, tais como microalgas e cianobactérias.

[0034] Existem várias formas de RuBisCO na natureza (Tabita et al, J Exp Bot. 2008; 59 (7): 1515-24. doi: 10.1093/jxb/erm361). As formas I, II e III catalisam as reações de carboxilação e oxigenação da ribulose-1,5-bifosfato. A Forma I está presente em eucariotos e bactérias. Consiste em dois tipos de subunidades: subunidades grandes (RbcL) e subunidades pequenas (RbcS). O complexo enzimático funcional é um hexadecâmero que consiste em oito subunidades L e oito subunidades S. A montagem correta dessas subunidades também requer a intervenção de pelo menos uma chaperona

específica: RbcX (Liu et al., *Nature*. 2010 14 de janeiro; 463 (7278): 197–202. doi: 10.1038/nature08651). A forma II é encontrada principalmente em algas proteobactérias, archaea (Archaea ou archaebacteria) e dinoflageladas. Sua estrutura é muito mais simples: é um homodímero (formado por duas subunidades RbcL idênticas). Dependendo do organismo, os genes que codificam um RuBisCO tipo I podem ser chamados de *rbcL/rbcS* (por exemplo, *Synechococcus elongatus*), ou *cbxLC/cbxSC*, *cfxLC/cfxSC*, *cbbL/cbbS* (por exemplo, *Cupriavidus necator*). Dependendo do organismo, os genes que codificam um RuBisCO tipo II são geralmente chamados de *cbbM* (por exemplo, *Rhodospirillum rubrum*). A forma III está presente na archaea. É geralmente encontrada na forma de dímeros da subunidade RbcL, ou em pentâmeros de dímeros. Dependendo do organismo, os genes que codificam um RuBisCO do tipo III podem ser designados por *rbcL* (por exemplo, *Thermococcus kodakarensis*), *cbbL* (por exemplo, *Haloferax* sp.).

[0035] Duas classes de PRKs são conhecidas: as enzimas de classe I encontradas em proteobactérias são octâmeras, enquanto as enzimas de classe II encontradas em cianobactérias e plantas são tetrâmeras ou dímeras. Dependendo do organismo, os genes que codificam um PRK podem ser chamados *prk* (por exemplo, *Synechococcus elongatus*), *prkA* (por exemplo, *Chlamydomonas reinhardtii*), *prkB* (por

exemplo, *Escherichia coli*), *prk1*, *prk2* (por exemplo, *Leptolyngbya* sp.), *cbbP* (por exemplo, *Nitrobacter vulgaris*) ou *cfxP* (por exemplo, *Cupriavidus necator*).

[0036] No caso em que o microrganismo utilizado não expressar naturalmente um RuBisCO funcional e um PRK funcional, o referido microrganismo é geneticamente modificado para expressar RuBisCO e PRK heterólogos. Vantajosamente, em tal caso, o microrganismo é transformado de modo a integrar no seu genoma um ou mais cassetes de expressão integrando as sequências que codificam as referidas proteínas e, vantajosamente, os fatores de transcrição apropriados. Dependendo do tipo de RuBisCO a ser expresso, também pode ser necessário ter uma ou mais proteínas chaperonas expressas pelo microrganismo, a fim de promover a montagem adequada das subunidades que formam o RuBisCO. Este é particularmente o caso do RuBisCO do tipo I, onde a introdução e a expressão de genes que codificam uma chaperona específica (*Rbcx*) e chaperonas generalistas (*GroES* e *GroEL*, por exemplo) são necessárias para obter um RuBisCO funcional. O pedido WO2015/107496 descreve em detalhe como modificar geneticamente uma levedura para expressar um RuBisCO do tipo I e PRK funcional. Também é possível referir-se ao método descrito em GUADALUPE-MEDINA et al. (Biotechnology for Biofuels, 6, 125, 2013).

[0037] Em uma modalidade, o microrganismo é

geneticamente modificado para expressar um RuBisCO do tipo I. Em outra modalidade, o microrganismo é geneticamente modificado para expressar um RuBisCO do tipo II. Em outra modalidade, o microrganismo é geneticamente modificado para expressar um RuBisCO do tipo III.

[0038] As Tabelas 1 e 2 abaixo listam, como exemplos, as sequências que codificam RuBisCO e PRK que podem ser usadas para transformar um microrganismo para expressar um RuBisCO funcional e um PRK funcional.

Tabela 1: Exemplos de sequências que codificam um RuBisCO

Gene	GenBank	GI	Organismo
<i>rbcL</i>	BAD78320.1	56685098	<i>Synechococcus elongatus</i>
<i>rbcS</i>	BAD78319.1	56685097	<i>Synechococcus elongatus</i>
<i>cbbL2</i>	CAJ96184.1	113529837	<i>Cupriavidus necator</i>
<i>cbbS</i>	P09658.2	6093937	<i>Cupriavidus necator</i>
<i>cbbM</i>	YP_427487.1	132036	<i>Rhodospirillum rubrum</i>
<i>cbbM</i>	Q21YM9.1	115502580	<i>Rhodofeavax ferrireducens</i>
<i>cbbM</i>	Q479W5.1	115502578	<i>Dechloromonas aromatic</i>

<i>rbcL</i>	093627.5	37087684	<i>Thermococcus kodakarensis</i>
<i>cbbL</i>	CQR50548.1	811260688	<i>Haloferax</i> sp. <i>Arc-Hr</i>

Tabela 2: Exemplos de sequências que codificam um PRK

Gene	GenBank	GI	Organismo
<i>prk</i>	BAD78757.1	56685535	<i>Synechococcus elongatus</i>
<i>cfxP</i>	P19923.3	125575	<i>Cupriavidus necator</i>
PRK	P09559.1	125579	<i>Spinacia oleracea</i>
<i>cbbP</i>	P37100.1	585367	<i>Nitrobacter vulgaris</i>

Inibição da glicólise

[0039] De acordo com a invenção, a via da glicólise é pelo menos parcialmente inibida, de modo que o microrganismo não é mais capaz de usar essa via metabólica normalmente (Figura 1 - glicólise). Em outras palavras, o microrganismo não tem mais a capacidade de assimilar a glicose de maneira semelhante a um microrganismo do tipo selvagem, no qual a via da glicólise não foi inibida (independentemente de qualquer outra modificação genética).

[0040] Em uma modalidade particular, o microrganismo é geneticamente modificado para inibir, total ou parcialmente, a glicólise a jusante da produção de gliceraldeído-3-fosfato (G3P).

[0041] Por exemplo, a glicólise é inibida a montante

da produção de 1,3-bifosfo-D-glicerato (1,3-BPG) ou a montante da produção de 3-fosfoglicerato (3PG).

[0042] Dependendo do microrganismo, as reações envolvidas entre o gliceraldeído-3-fosfato (G3P) e o 3-fosfoglicerato (3PG) podem ser administradas (i) por duas enzimas que agem concomitantemente, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (EC 1.2.1.12, abreviado GAPDH ou mais raramente G3PDH) e fosfoglicerato quinase (EC 2.7.2.3, abreviado como PGK), ou (ii) por uma única enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase não fosforilante (EC 1.2.1.9, abreviado como GAPN).

[0043] A gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) catalisa a conversão reversível de G3P em 1,3-bifosfo-D-glicerato (1,3-BPG), utilizando o par NAD⁺/NADH como doador/receptor de elétrons na direção da reação. Dependendo do organismo, os genes que codificam GAPDH podem ser chamados *gapA*, *gapB*, *gapC* (por exemplo, *Escherichia coli*, *Arabidopsis thaliana*), GAPDH, GAPD, G3PD, GAPDHS (por exemplo, *Homo sapiens*), TDH1, TDH2, TDH3 (por exemplo, *Saccharomyces cerevisiae*). *gap*, *gap2*, *gap3* (por exemplo, *Mycobacterium* sp., *Nostoc* sp.).

[0044] A fosfoglicerato quinase (PGK) catalisa a conversão reversível de 1,3-BPG em 3PG, usando o par ATP/ADP como cofator. Dependendo do organismo, os genes que codificam PGK podem ser designados por PGK, PGK1, PGK1, PGK2, PGK3,

pgkA, PGKB, PGKC, cbbK, cbbKC, cbbKP (por exemplo, *Cupriavidus necator*).

[0045] A gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPN) não fosforilante catalisa a conversão de G3P em 3PG, sem passar por 1,3-BPG. Esta reação é catalisada na presença do par cofator NADP⁺/NADPH, que atua como um aceitador de elétrons. Dependendo do organismo, os genes que codificam GAPN podem ser denominados GAPN (por exemplo, *Bacillus* sp., *Streptococcus* sp.), GAPN1 (por exemplo, *Chlamydomonas* sp.).

[0046] Em um exemplo particular, o microrganismo é geneticamente modificado de modo que a expressão do gene que codifica a gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase é pelo menos parcialmente inibida. Preferencialmente, a expressão gênica é completamente inibida.

[0047] Alternativamente ou adicionalmente, a expressão do gene que codifica a fosfoglicerato quinase pode também ser pelo menos parcialmente inibida. Preferencialmente, a expressão gênica é completamente inibida.

[0048] Alternativamente, o microrganismo é geneticamente modificado de modo que a expressão do gene que codifica a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase não fosforilante é pelo menos parcialmente inibida. Preferencialmente, a expressão gênica é completamente inibida.

[0049] As Tabelas 3, 4 e 5 abaixo listam, como exemplos, as sequências que codificam uma gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, uma fosfoglicerato quinase e uma gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase não fosforilante que pode ser inibida dependendo do microrganismo alvo. O especialista sabe qual gene corresponde à enzima de interesse a ser inibida dependendo do microrganismo

Tabela 3: Exemplos de sequências que codificam uma GAPDH

Gene	GenBank	GI	Organismo
gapA	NP_416293.1	947679	<i>Escherichia coli</i>
TDH1	NP_012483.3	398364523	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
TDH2	NP_012542.1	6322468	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
TDH3	NP_011708.3	398366083	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
gap	ECC36949.1	378544675	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
gap2	P34917.2	92090599	<i>Nostoc</i> sp.

Tabela 4: Exemplos de sequências que codificam um PGK

Gene	GenBank	GI	Organismo
pgk	AKL94701.1	831186507	<i>Clostridium aceticum</i>
PGK1	NP_009938.2	10383781	<i>Saccharomyces</i>

			<i>cerevisiae</i>
<i>pgk</i>	BAG04189.1	166089481	<i>Microcystis aeruginosa</i>
PGKA	AAG34561.2	22711882	<i>Dictyostelium discoideum</i>
PGKB	CAJ03534.1	68126221	<i>Leishmania major</i>
<i>cbbKC</i>	AAC43444.1	976365	<i>Cupriavidus necator</i>
<i>pgk</i>	CAK45271.1	4982539	<i>Aspergillus niger</i>
<i>pgk</i>	EAU38870.1	4354973	<i>Aspergillus terreus</i>

Tabela 5: Exemplos de sequências que codificam um GAPN

Gene	GenBank	GI	Organismo
gapN	CUB58597.1	924094571	<i>Bacillus subtilis</i>
GAPN	NP_358622.1	933338	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
GAPN1	EDP03116.1	542583	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>

[0050] Em geral, a produção de 3-fosfoglicerato (3PG) não é mais possível através da glicólise, ou pelo menos significativamente reduzida, no microrganismo geneticamente modificado de acordo com a invenção.

[0051] Em uma modalidade exemplificativa particular, o microrganismo é uma levedura do gênero *Saccharomyces cerevisiae* em que a expressão dos genes TDH1 (Gene ID:

853395), TDH2 (Gene ID: 853465) e/ou TDH3 (Gene ID: 853106) é pelo menos parcialmente inibida.

[0052] Em outra modalidade exemplificativa particular, o microrganismo é uma levedura do gênero *Saccharomyces cerevisiae* em que a expressão do gene PGK1 (Gene ID: 5230) é pelo menos parcialmente inibida.

[0053] Em outra modalidade exemplificativa, o microrganismo é uma levedura do gênero *Saccharomyces cerevisiae* em que a expressão do gene PGK1 (Gene ID: 5230), a expressão do gene TDH1 (Gene ID: 853395), TDH2 (Gene ID: 853465) e/ou a expressão do gene TDH3 (Gene ID: 853106) é pelo menos parcialmente inibida.

[0054] Em uma modalidade exemplar particular, o microrganismo é uma bactéria *Escherichia coli* na qual a expressão do gene *gapA* (Gene ID: 947679) é pelo menos parcialmente inibida.

[0055] Em outra modalidade exemplificativa particular, o microrganismo uma bactéria *Escherichia coli* em que a expressão do gene *pgk* (Gene ID: 947414) é pelo menos parcialmente inibida.

[0056] Em outra modalidade exemplificativa, o microrganismo uma bactéria de *E. coli* em que a expressão do gene *pgk* (Gene ID: 947414) e/ou a expressão do gene *gapA* (Gene ID: 947679) são pelo menos parcialmente inibidas.

[0057] De acordo com a invenção, o microrganismo

geneticamente modificado, que expressa um RuBisCO funcional e um PRK funcional, é por outro lado capaz de produzir 3PG por captura de CO₂ a partir de ribulose-5-fosfato produzido pela via das pentose-fosfato (Figura 2).

[0058] Uma vez que as enzimas necessárias para o metabolismo de 3PG para piruvato não são inibidas no microrganismo, o referido microrganismo pode então metabolizar 3PG para produzir piruvato e ATP.

[0059] Assim, o microrganismo geneticamente modificado é capaz de produzir cofatores de piruvato e NADPH usando CO₂ como fonte complementar de carbono.

[0060] No contexto da invenção, a fonte de carbono "complementar" significa que o microrganismo usa CO₂ como uma fonte parcial de carbono, além dos átomos de carbono fornecidos pelos açúcares fermentáveis (glicose, galactose, sacarose, frutose etc.), que constituem a maior ou principal fonte de carbono para a produção de piruvato.

[0061] Assim, o microrganismo geneticamente modificado de acordo com a invenção torna possível aumentar o rendimento de carbono, fixando e utilizando o CO₂ normalmente perdido durante o metabolismo da glicose através da via das pentose-fosfato, para a produção de piruvato (e subsequentemente de moléculas de interesse).

Inibição da ramificação oxidativa da via das pentose-fosfato

[0062] Em uma modalidade particular, o microrganismo geneticamente modificado de acordo com a invenção também é modificado de tal forma que a ramificação oxidativa da via das pentose-fosfato, também é, pelo menos parcialmente, inibida.

[0063] Preferencialmente, o microrganismo é geneticamente modificado para inibir a ramificação oxidativa da via das pentose-fosfato a montante da produção de ribulose-5-fosfato (Figura 1 - via das pentose-fosfato).

[0064] A interrupção da ramificação oxidativa da via das pentose-fosfato a montante da produção de ribulose-5-fosfato (Ru5P) visa especificamente uma ou mais reações no processo de síntese de Ru5P a partir da glicose-6-fosfato (G6P). Esta síntese é geralmente catalisada pelas ações sucessivas de três enzimas: (i) glicose-6-fosfato desidrogenase (EC. 1.1.1.49, abreviado G6PDH), (ii) 6-fosfogluconolactonase (EC 3.1.1.31, abreviado PGL), e (iii) 6-fosfogluconato desidrogenase (EC 1.1.1.44, abreviado PGD).

[0065] A glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) catalisa a primeira reação da via das pentose-fosfato, isto é, a oxidação de glicose-6-fosfato em 6-fosfogluconolactona (6PGL), com redução concomitante de uma molécula de NADP⁺ para NADPH. Dependendo do organismo, os genes que codificam G6PDH podem ser chamados G6PD (por exemplo, em *Homo sapiens*), G6pdx (por exemplo, em *Musculus*), gsdA (por exemplo, em

Aspergillus nidulans), zwf (por exemplo, em *Escherichia coli*), ou ZWF1 (por exemplo, em *Saccharomyces cerevisiae*).

[0066] A 6-fosfogluconolactonase (PGL) é uma hidrolase que catalisa a síntese de 6-fosfogluconato (6PGA) a partir de 6PGL. Dependendo do organismo, os genes que codificam o PGL podem ser chamados *pgl* (por exemplo, em *Escherichia coli*, *Synechocystis* sp.) *pgls* (por exemplo, em *Rhodobacteraceae bacterium*), ou *SOL* (por exemplo, em *Saccharomyces cerevisiae*).

[0067] A 6-fosfogluconato desidrogenase (PGD) é uma oxidorredutase que catalisa a síntese de Ru5P a partir de 6PGA, com redução concomitante de uma molécula de NADP⁺ para NADPH e a emissão de uma molécula de CO₂. Dependendo do organismo, os genes que codificam PGD podem ser chamados *gnd* (por exemplo, em *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*), *PGD* (por exemplo, em *Homo sapiens*), *gntZ* (por exemplo, em *Bacillus subtilis*), ou 6-PGDH (por exemplo, em *Lactobacillus paracollinoides*).

[0068] Em um exemplo particular, o microrganismo é geneticamente modificado de modo que a expressão do gene que codifica a glicose-6-fosfato desidrogenase é pelo menos parcialmente inibida. Preferencialmente, a expressão gênica é completamente inibida.

[0069] Alternativamente ou adicionalmente, o microrganismo é geneticamente modificado de modo que a

expressão do gene que codifica a 6-fosfogluconolactonase é pelo menos parcialmente inibida. Preferencialmente, a expressão gênica é completamente inibida.

[0070] Alternativamente ou adicionalmente, o microrganismo é geneticamente modificado de modo que a expressão do gene que codifica a 6-fosfogluconato desidrogenase é pelo menos parcialmente inibida. Preferencialmente, a expressão gênica é completamente inibida.

[0071] As Tabelas 6, 7 e 8 abaixo listam, como exemplos, as sequências que codificam uma glicose-6-fosfato desidrogenase, uma 6-fosfogluconolactonase e uma 6-fosfogluconato desidrogenase que podem ser inibidas dependendo do microrganismo alvo. O especialista sabe qual gene corresponde à enzima de interesse a ser inibida dependendo do microrganismo.

Tabela 6: Exemplos de sequências que codificam uma G6PDH

Gene	GenBank	GI	Organismo
<i>zwf</i>	BAA15660.1	946370	<i>Escherichia coli</i>
ZWF1	NP_014158.1	6324088	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
gsdA	CAA54841.1	1523786	<i>Aspergillus nidulans</i>
gsdA	CAK37895.1	4979751	<i>Aspergillus niger</i>

gsdA	EAU38380.1	4316232	<i>Aspergillus terreus</i>
------	------------	---------	----------------------------

Tabela 7: Exemplos de sequências que codificam um PGL

Gene	GenBank	GI	Organismo
<i>pgl</i>	BAA35431.1	4062334	<i>Escherichia coli</i>
<i>pgl</i>	BAK51770.1	339275283	<i>Synechocystis</i>
<i>pgls</i>	KPQ07176.1	938272062	<i>Rhodobacteraceae bacterium</i>
SOL3	KZV10901.1	1023943655	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Tabela 8: Exemplos de sequências que codificam um PGD

Gene	GenBank	GI	Organismo
<i>gnd</i>	ALI40222.1	937519736	<i>Escherichia coli</i>
GND1	EDN62420.1	151944127	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>gntZ</i>	NP_391888.1	16081060	<i>Bacillus subtilis</i>
6-PGDH	WP_054711110.1	938929230	<i>Lactobacillus paracollinoides</i>

[0072] Em geral, a produção de ribulose-5-fosfato (Ru5P) já não é possível através da via das pentose-fosfato, ou pelo menos significativamente reduzida, no microrganismo geneticamente modificado de acordo com a invenção.

[0073] Em uma modalidade exemplificativa particular,

o microrganismo é uma levedura do gênero *Saccharomyces cerevisiae* em que a expressão do gene ZWF1 é pelo menos parcialmente inibida.

[0074] Em um exemplo particular, a levedura do gênero *Saccharomyces cerevisiae* é geneticamente modificada de modo que a expressão dos genes TDH1, TDH2, TDH3 e/ou PGK1 e a expressão do gene ZWF1 são pelo menos parcialmente inibidas.

[0075] Em outra modalidade exemplificativa particular, o microrganismo uma bactéria do gênero *Escherichia coli* em que a expressão do gene zwf é pelo menos parcialmente inibida.

[0076] Em um exemplo particular, a bactéria do gênero *Escherichia coli* é geneticamente modificada de modo que a expressão dos genes gapA e/ou pgk e a expressão do gene zwf são pelo menos parcialmente inibidas.

[0077] Em outro exemplo, o microrganismo é um fungo filamentoso do gênero *Aspergillus*, tal como *Aspergillus niger* ou *Aspergillus terreus*, geneticamente modificado para que a expressão dos genes pgk e gsdA seja parcialmente inibida.

[0078] De acordo com a invenção, o microrganismo geneticamente modificado, que expressa um RuBisCO funcional e um PRK funcional, e cuja via da glicólise e ramificação oxidativa da via das pentose-fosfato são pelo menos parcialmente inibidas, não é mais capaz de produzir 3PG

através da via da glicólise ou Ru5P através da ramificação oxidativa da via das pentose-fosfato. Por outro lado, é capaz de produzir Ru5P desviando a produção de frutose-6-fosfato (F6P) e/ou gliceraldeído-3-fosfato (G3P), produzidos no início da glicólise (a montante da inibição). Esta produção é possível graças às enzimas transcetolase (EC 2.2.1.1), transaldolase (EC 2.2.1.2), ribose-5-fosfato isomerase (EC 5.3.1.6) e ribulose-5-fosfato epimerase (EC 5.1.3.1) naturalmente presentes e ativas nos microrganismos (Figura 3).

[0079] Uma vez que as enzimas necessárias para o metabolismo de 3PG para piruvato não são inibidas no microrganismo de acordo com a invenção, o referido microrganismo pode então metabolizar 3PG para produzir piruvato e ATP.

[0080] Assim, o microrganismo geneticamente modificado é capaz de produzir piruvato usando CO₂ exógeno como fonte complementar de carbono.

[0081] Assim, o microrganismo geneticamente modificado de acordo com a invenção torna possível aumentar o rendimento de carbono, fixando e utilizando CO₂ exógeno, para a produção de piruvato (e subsequentemente de moléculas de interesse). Aqui, novamente, há um aumento no rendimento de carbono.

Inibição da via de Entner-Doudoroff

[0082] Em uma modalidade particular, o microrganismo geneticamente modificado de acordo com a invenção tem uma via de Entner-Doudoroff e esta é pelo menos parcialmente inibida. Esta via, encontrada principalmente em bactérias (especialmente bactérias Gram-negativas), é uma alternativa à glicólise e à via das pentoses para a produção de piruvato a partir da glicose. Mais precisamente, esta via liga-se à via das pentose-fosfato no P-gluconato para alimentar a glicólise, particularmente no piruvato.

[0083] Preferencialmente, o microrganismo é geneticamente modificado para inibir as reações da via de Entner-Doudoroff a jusante da produção de 6-fosfogluconato. Essa inibição elimina uma possível via concorrente e garante a disponibilidade do 6-fosfogluconato como substrato para a engenharia de PRK/RuBisCO.

[0084] A interrupção da via de Entner-Doudoroff a jusante da produção de 6-fosfogluconato atinge especificamente uma ou mais reações no processo de síntese de piruvato a partir de 6-fosfogluconato. Esta síntese é iniciada pelas ações sucessivas de duas enzimas: (i) 6-fosfogluconato desidratase ("EDD" - EC. 4.2.1.12), e (ii) 2-desidro-3-desoxi-fosfogluconato aldolase ("EDA" - EC 4.1.2.14).

[0085] A 6-fosfogluconato desidratase catalisa a desidratação do 6-fosfogluconato em 2-ceto-3-desoxi-6-

fosfogluconato. Dependendo do organismo, os genes que codificam a 6-fosfogluconato desidratase podem ser denominados *edd* (GenBank NP_416365, por exemplo, em *Escherichia coli*), ou *ilvD* (por exemplo, em *Mycobacterium* sp.).

[0086] A 2-desidro-3-desoxi-fosfogluconato aldolase catalisa a síntese de uma molécula de piruvato e uma molécula de gliceraldeído-3-fosfato a partir do 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato produzido por 6-fosfogluconato desidratase. Dependendo do organismo, os genes que codificam a 2-desidro-3-desoxi-fosfogluconato aldolase podem ser chamados de *eda* (GenBank NP_416364, por exemplo, em *Escherichia coli*), ou *kdgA* (por exemplo, em *Thermoproteus tenax*), ou *dgaF* (por exemplo, em *Salmonella typhimurium*).

[0087] Em um exemplo particular, o microrganismo é geneticamente modificado de modo que a expressão do gene que codifica a 6-fosfogluconato desidratase é pelo menos parcialmente inibida. Preferencialmente, a expressão gênica é completamente inibida.

[0088] Alternativamente ou adicionalmente, o microrganismo é geneticamente modificado de modo que a expressão do gene que codifica a 2-desidro-3-desoxi-fosfogluconato aldolase é pelo menos parcialmente inibida. Preferencialmente, a expressão gênica é completamente inibida.

[0089] As Tabelas 9 e 10 abaixo listam, como exemplos, as sequências que codificam uma 6-fosfogluconato desidratase e uma 2-desidro-3-desoxi-fosfogluconato aldolase que podem ser inibidas dependendo do microrganismo alvo. O especialista sabe qual gene corresponde à enzima de interesse a ser inibido dependendo do microrganismo.

Tabela 9: Exemplos de sequências que codificam um EDD

Gene	GenBank	GI	Organismo
edd	NP_416365.1	16129804	<i>Escherichia coli</i>
ilvD	CND70554.1	893638835	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
edd	AJQ65426.1	764046652	<i>Salmonella enterica</i>

Tabela 10: Exemplos de sequências que codificam uma EDA

Gene	GenBank	GI	Organismo
eda	AKF72280.1	817591701	<i>Escherichia coli</i>
kdgA	Q704D1.1	74500902	<i>Thermoproteus tenax</i>
eda	O68283.2	81637643	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

[0090] Em geral, nesta modalidade, a produção de piruvato não é mais possível através da via de Entner-Doudoroff, ou pelo menos significativamente reduzida.

[0091] Em uma modalidade exemplificativa particular, o microrganismo é uma bactéria do gênero *Escherichia coli* em que a expressão do gene edd é pelo menos parcialmente

inibida.

[0092] Em um exemplo particular, a bactéria do gênero *Escherichia coli* é geneticamente modificada de modo que a expressão dos genes *gapA* e *edd* é pelo menos parcialmente inibida.

[0093] De acordo com a invenção, o microrganismo geneticamente modificado, que expressa um RuBisCO funcional e um PRK funcional, e cuja via da glicólise e via de Entner-Doudoroff são pelo menos parcialmente inibidas, não é mais capaz de produzir 3PG pela glicólise ou piruvato pela Via de Entner-Doudoroff. O fluxo de carbono a partir da glicose é, portanto, de preferência direcionado para a engenharia de PRK/RuBisCO.

Produção de moléculas de interesse

[0094] De acordo com a invenção, o microrganismo geneticamente modificado é transformado de modo a produzir uma molécula exógena de interesse e/ou superproduzir uma molécula endógena de interesse.

[0095] No contexto da invenção, a molécula de interesse se refere preferencialmente a uma pequena molécula orgânica com uma massa molecular menor ou igual a 0,8 kDa.

[0096] Em geral, modificações genéticas feitas no microrganismo, como descrito acima, melhoram o rendimento de carbono das vias de síntese e/ou bioconversão de moléculas de interesse.

[0097] No contexto da invenção, o rendimento "melhorado" se refere à quantidade do produto acabado. Em geral, no contexto da invenção, o rendimento de carbono corresponde à razão entre a quantidade de produto acabado e a quantidade de açúcar fermentável, particularmente em peso. De acordo com a invenção, o rendimento de carbono é aumentado nos microrganismos geneticamente modificados de acordo com a invenção, em comparação com microrganismos do tipo selvagem, colocados sob condições de cultura idênticas. Vantajosamente, o rendimento de carbono é aumentado em 2%, 5%, 10%, 15%, 18%, 20% ou mais. O microrganismo geneticamente modificado de acordo com a invenção pode produzir uma quantidade maior de moléculas de interesse (produto acabado) do que moléculas heterólogas produzidas por um microrganismo geneticamente modificado simplesmente para produzir ou superproduzir essa molécula. De acordo com a invenção, o microrganismo geneticamente modificado também pode produzir em excesso uma molécula endógena em comparação com o microrganismo do tipo selvagem. A superprodução de uma molécula endógena é entendida principalmente em termos de quantidades. Vantajosamente, o microrganismo geneticamente modificado produz pelo menos 20%, 30%, 40%, 50% ou mais em peso da molécula endógena do que o microrganismo do tipo selvagem. Vantajosamente, o microrganismo de acordo com a invenção é geneticamente modificado de modo a produzir ou

superproduzir pelo menos uma molécula entre aminoácidos, terpenóides, terpenos, vitaminas e/ou precursores de vitaminas, esteróis, flavonóides, ácidos orgânicos, polióis, poliaminas, moléculas aromáticas obtidas a partir de hidroxilação estereoespecífica, através de um citocromo p450 dependente de NADP etc.

[0098] Em um exemplo particular, o microrganismo é geneticamente modificado para produzir em excesso pelo menos um aminoácido, selecionado preferencialmente de arginina, lisina, metionina, treonina, prolina, glutamato, homosserina, isoleucina, valina e ácido γ -aminobutírico.

[0099] Em um exemplo particular, o microrganismo é geneticamente modificado para produzir ou superproduzir moléculas da via de terpenóide, tal como o farneseno, e da via do terpeno.

[00100] Em um exemplo particular, o microrganismo é geneticamente modificado para produzir ou superproduzir uma vitamina ou precursor, selecionado preferencialmente de pantoato, pantotenato, transneurosporeno, filoquinona e tocoferóis.

[00101] Em um exemplo particular, o microrganismo é geneticamente modificado para produzir ou superproduzir um esterol, preferencialmente selecionado de esqualeno, colesterol, testosterona, progesterona e cortisona.

[00102] Em um exemplo particular, o microrganismo é

geneticamente modificado para produzir ou superproduzir um flavonóide, preferencialmente selecionado de frambinona e vestinona.

[00103] Em um exemplo particular, o microrganismo é geneticamente modificado para produzir ou superproduzir um ácido orgânico, preferencialmente selecionado a partir de ácido cumárico, ácido 3-hidroxipropiônico, ácido cítrico, ácido oxálico, ácido succínico e ácido itacônico.

[00104] Em um exemplo particular, o microrganismo é geneticamente modificado para produzir ou superproduzir um poliol, selecionado preferencialmente de sorbitol, xilitol e glicerol.

[00105] Em um exemplo particular, o microrganismo é geneticamente modificado para produzir ou superproduzir uma poliamina, preferencialmente a espermidina.

[00106] Em um exemplo particular, o microrganismo é geneticamente modificado para produzir ou superproduzir uma molécula aromática a partir de uma hidroxilação estereoespecífica, via um citocromo p450 dependente de NADP, selecionado preferencialmente de fenilpropanóides, terpenos, lipídios, taninos, fragrâncias, hormônios.

[00107] No caso em que a molécula de interesse é obtida por bioconversão, o microrganismo geneticamente modificado é vantajosamente cultivado em um meio de cultura incluindo o substrato a ser convertido. Em geral, a produção

ou superprodução de uma molécula de interesse por um microrganismo geneticamente modificado de acordo com a invenção é obtida cultivando o referido microrganismo em um meio de cultura apropriado conhecido do especialista.

[00108] O termo "meio de cultura apropriado" geralmente se refere a um meio de cultura estéril que fornece nutrientes essenciais ou benéficos para a manutenção e/ou crescimento do referido microrganismo, tais como fontes de carbono; fontes de nitrogênio, tais como sulfato de amônia; fontes de fósforo, por exemplo, fosfato de potássio monobásico; oligoelementos, por exemplo, sais de cobre, iodeto, ferro, magnésio, zinco ou molibdato; vitaminas e outros fatores de crescimento, tais como aminoácidos ou outros promotores de crescimento. Um agente antiespumante pode ser adicionado conforme necessário. De acordo com a invenção, este meio de cultura apropriado pode ser quimicamente definido ou complexo. O meio de cultura pode assim ser idêntico ou semelhante em composição a um meio sintético, como definido por Verduyn et al. (Yeast. 1992. 8: 501-17), adaptado por Visser et al. (Biotechnology and bioengineering. 2002. 79: 674-81), ou disponível comercialmente tal como meio de base de nitrogênio de levedura (YNB) (MP Biomedicals ou Sigma-Aldrich).

[00109] Em particular, o meio de cultura pode incluir uma fonte de carbono simples, tal como glicose, galactose,

sacarose, melaço ou os subprodutos destes açúcares, opcionalmente suplementados com CO₂ como co-substrato de carbono. De acordo com a presente invenção, a fonte de carbono simples deve permitir o crescimento normal do microrganismo de interesse. Também é possível, em alguns casos, usar uma fonte complexa de carbono, tal como biomassa lignocelulósica, palha de arroz ou amido. O uso de uma fonte complexa de carbono geralmente requer pré-tratamento antes do uso.

[00110] Em uma modalidade particular, o meio de cultura contém pelo menos uma fonte de carbono entre monossacarídeos como glicose, xilose ou arabinose, dissacarídeos tais como sacarose, ácidos orgânicos tais como acetato, butirato, propionato ou valerato para promover diferentes tipos de poli-hidroxialcanoato (PHA), glicerol tratado ou não tratado.

[00111] Dependendo das moléculas a serem produzidas e/ou superproduzidas, é possível explorar o fornecimento de fatores nutricionais (N, O, P, S, K, Mg, Fe, Mn, Co, Cu, Ca, Sn; Koller et al, *Microbiology Monographs*, G.-Q. Chen, 14: 85-119, (2010)). Este é particularmente o caso para promover a síntese e acumulação intracelular de poli-hidroxialcanoato (PHA) incluindo poli-hidroxibutirato (PHB).

[00112] De acordo com a invenção, qualquer método de cultura que permita a produção em escala industrial de

moléculas de interesse pode ser considerado. Vantajosamente, a cultura é feita em biorreatores, especialmente em modo de cultura em lote, alimentado em lote e/ou contínuo. Preferencialmente, a cultura associada com a produção da molécula de interesse é em modo alimentado em lote correspondendo a um fornecimento controlado de um ou mais substratos, por exemplo, pela adição de uma solução concentrada de glicose cuja concentração pode ser entre 200 g/L e 700 g /EU. Um fornecimento controlado de vitaminas durante o processo pode também ser benéfico para a produtividade (Alfenore et al., Appl Microbiol Biotechnol. 2002. 60: 67-72). Também é possível adicionar uma solução de sal de amônio para limitar o suprimento de nitrogênio.

[00113] A fermentação é geralmente realizada em biorreatores, com possíveis etapas de pré-culturas sólidas e/ou líquidas em frascos de Erlenmeyer, com um meio de cultura apropriado contendo pelo menos uma fonte de carbono simples e/ou um suprimento de CO₂ exógeno, necessário para a produção da molécula interesse.

[00114] Em geral, as condições de cultura dos microrganismos de acordo com a invenção são facilmente adaptáveis pelo perito, dependendo do microrganismo e/ou da molécula a ser produzida/superproduzida. Por exemplo, a temperatura da cultura está entre 20 °C e 40 °C para leveduras, preferivelmente entre 28 °C e 35 °C, e mais

particularmente em torno de 30 °C, para *S. cerevisiae*. A temperatura da cultura é entre 25 °C e 35 °C, preferivelmente 30 °C, para o *Cupriavidus necator*.

[00115] A invenção, portanto, também se refere ao uso de um microrganismo geneticamente modificado de acordo com a invenção, para a produção ou superprodução de uma molécula de interesse, preferencialmente selecionada de aminoácidos, peptídeos, proteínas, vitaminas, esteróis, flavonóides, terpenos, terpenóides, ácidos graxos, polióis e ácidos orgânicos.

[00116] A invenção também se refere a um processo biotecnológico para a produção de pelo menos uma molécula de interesse, caracterizado por compreender uma etapa de cultivar um microrganismo geneticamente modificado de acordo com a invenção, sob condições que permitem a síntese ou bioconversão, pelo referido microrganismo, da referida molécula de interesse e, opcionalmente, uma etapa de recuperação e/ou purificação da referida molécula de interesse.

[00117] Em uma modalidade particular, o microrganismo é geneticamente modificado para expressar pelo menos uma enzima envolvida na síntese da referida molécula de interesse.

[00118] Em uma outra modalidade particular, o microrganismo é geneticamente modificado para expressar pelo

menos uma enzima envolvida na bioconversão da referida molécula de interesse.

[00119] A invenção também se refere a um processo para a produção de uma molécula de interesse que compreende: (i) inserir pelo menos uma sequência que codifica uma enzima envolvida na síntese ou bioconversão da referida molécula de interesse em um microrganismo recombinante de acordo com a invenção, (ii) cultivar da referida microrganismo em condições que permitam a expressão da referida enzima e opcionalmente (iii) recuperar e/ou purificar a referida molécula de interesse.

[00120] Por exemplo, é possível superproduzir citrato por um fungo, particularmente um fungo filamentoso, tal como o *Aspergillus niger*, geneticamente modificado para expressar um PRK funcional e um RuBisCO funcional do tipo I ou II, e no qual a expressão dos genes *pgk* (Gene ID : 4982539) e *gsdA* (Gene ID: 497979751) são pelo menos parcialmente inibidos.

[00121] Também é possível superproduzir o ácido itacônico por um fungo, particularmente um fungo filamentoso, como *Aspergillus terreus* ou *Aspergillus niger*, geneticamente modificado para expressar um PRK funcional e um RuBisCO funcional do tipo I ou II, e no qual a expressão dos genes *pgk* (Gene ID: 4354973) e *gsdA* (Gene ID: 4316232) é pelo menos parcialmente inibida.

[00122] Da mesma forma, é possível produzir farneseno

por uma levedura como uma levedura do gênero *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada para expressar um PRK funcional e um RuBisCO funcional tipo I ou II, uma farneseno sintase e na qual a expressão de um gene PGK1 (Gene ID: 5230) é pelo menos parcialmente inibida.

[00123] Também é possível superproduzir o glutamato por uma bactéria, tal como uma bactéria do gênero *Escherichia coli*, geneticamente modificada para expressar um PRK funcional e um RuBisCO funcional do tipo I ou II, e na qual a expressão do gene *gapA* (Gene ID: 947679) é pelo menos parcialmente inibida. Esta superprodução pode também ocorrer em uma cepa em que pelo menos a inibição parcial do gene *gapA* é combinada com a inibição pelo menos parcial do gene *zwf* (Gene ID: 946370).

[00124] Da mesma forma, também é possível superproduzir o ácido γ -aminobutírico por uma bactéria, como uma bactéria do gênero *Escherichia coli*, geneticamente modificada para expressar um PRK funcional e um RuBisCO funcional tipo I ou II, bem como um glutamato descarboxilase *gadB* (Gene ID: 946058), e em que a expressão do gene *gapA* (Gene ID: 947679) é pelo menos parcialmente inibida. Esta superprodução pode também ocorrer em uma cepa em que pelo menos a inibição parcial do gene *gapA* é combinada com a inibição pelo menos parcial do gene *zwf* (Gene ID: 946370).

[00125] Da mesma forma, é possível superproduzir

ácido succínico e ácido oxálico por uma bactéria, tal como uma bactéria do gênero *Escherichia coli*, geneticamente modificada para expressar um PRK funcional e um RuBisCO funcional do tipo I ou II, bem como uma atividade enzimática permitindo oxidação de glioxilato em oxalato, preferencialmente glioxilato desidrogenase FPGLOXDH1 (mRNA: BAH29964.1), glioxilato oxidase GLO (mRNA: AOW73106.1), ou lactato desidrogenase LDHA (Gene ID: 3939), e em que a expressão dos genes gapA (Gene ID: 947679) e zwf (Gene ID: 946370) é pelo menos parcialmente inibida.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Análise de Bioinformática

c) Cálculo dos rendimentos teóricos

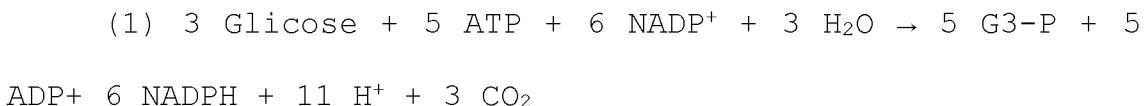
[00126] i) Comparação dos rendimentos de fixação de carbono a partir de glicose entre uma cepa do tipo selvagem utilizando a via das pentose-fosfato e glicólise e uma cepa modificada de acordo com a invenção

[00127] De modo a avaliar o benefício das modificações descritas de acordo com a invenção, os cálculos do rendimento teórico foram realizados com base na estequiometria das reações envolvidas.

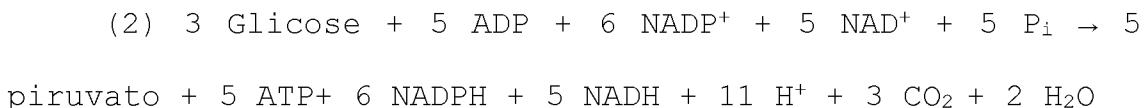
[00128] Dois cenários foram analisados: a melhoria proporcionada pela engenharia de PRK-RuBisCO (i) em uma cepa inibida para glicólise no rendimento de uma via Biosintética dependente de NADPH (por exemplo, síntese de farneseno), e

(ii) em uma cepa inibida por glicólise e para a ramificação oxidativa da via das pentose-fosfato no rendimento de uma via Biosintética de interesse (por exemplo, síntese de citrato).

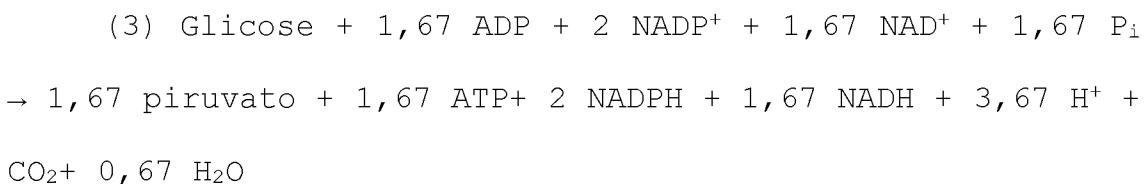
[00129] No contexto da melhoria das vias biossintéticas dependentes de NADPH, o equilíbrio teórico da formação de NADPH e gliceraldeído-3-fosfato (G3-P) a partir da glicose através da via das pentose-fosfato foi calculado de acordo com a seguinte equação (1):



[00130] Descendo para a formação de piruvato a partir do G3P, chegamos ao seguinte balanço:

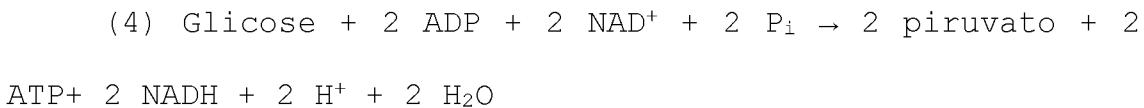


[00131] Se normalizarmos o balanço por um mol de glicose, obtemos o seguinte rendimento:



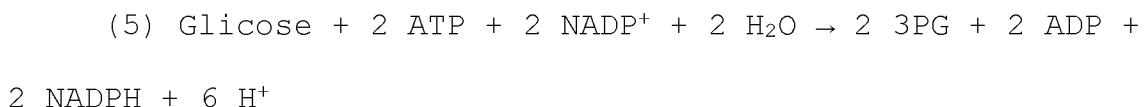
[00132] Assim, utilizando a via das pentose-fosfato, produzem-se 1,67 moles de piruvato e 2 moles de NADPH a partir de um mol de glicose. No entanto, um mol de carbono é perdido pela descarboxilação quando a ribulose-5-fosfato é formada pela 6-fosfogluconato desidrogenase (EC 1.1.1.44).

Em comparação, a formação de piruvato pela via da glicólise dá o seguinte rendimento:

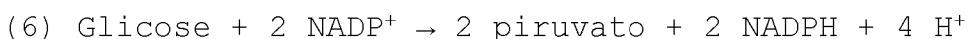


[00133] O rendimento teórico máximo da produção de piruvato pela via das pentose-fosfato é, portanto, 0,82 $\text{g}_{\text{piruvato}}/\text{g}_{\text{glicose}}$ (g de piruvato sintetizado, por g de glicose consumida), enquanto é 0,98 $\text{g}_{\text{piruvato}}/\text{g}_{\text{glicose}}$ pela via da glicólise.

[00134] Ao integrar a engenharia de PRK/RuBisCO em uma cepa inibida para glicólise (por exemplo, ΔPGK1 em levedura de *S. cerevisiae*), o fluxo de fixação de carbono é redirecionado para a ramificação oxidativa da via das pentose-fosfato e depois para a engenharia PRK/RuBisCO (ver Figura 2). Este fluxo está relacionado com o final da via da glicólise, ao nível da formação de 3-fosfoglicerato (3PG), com o seguinte rendimento:



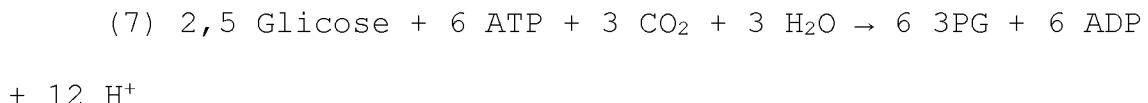
[00135] Descendo para a formação de piruvato a partir de 3PG, chegamos ao seguinte balanço:



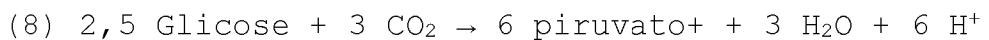
[00136] A integração das modificações de acordo com a invenção em um microrganismo torna possível recuperar a molécula de carbono perdida de outro modo pela

descarboxilação na via das pentoses. O rendimento teórico máximo de fixação de carbono é, portanto, 0,98 g_{piruvato}/g_{glicose}, o que melhora em 20,5% o rendimento obtido pela produção de piruvato pela via das pentose-fosfato, enquanto produz NADPH.

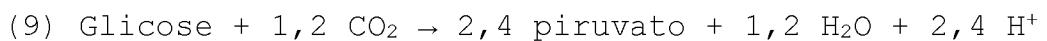
[00137] Em um segundo caso (ver Figura 3), a engenharia de PRK/RuBisCO é integrada a uma cepa que é inibida tanto pela glicólise (por exemplo, ΔPGK1 no caso da levedura *S. cerevisiae*) quanto pela ramificação oxidativa da via das pentose-fosfato (por exemplo, ΔZWF1 no caso da levedura *S. cerevisiae*). O equilíbrio teórico da formação de NADPH e 3-fosfoglicerato (3PG) a partir da glicose torna-se então



[00138] Descendo para a formação de piruvato a partir de 3PG, chegamos ao seguinte balanço



[00139] Se normalizarmos a balança por um mol de glicose, obtemos o seguinte rendimento:



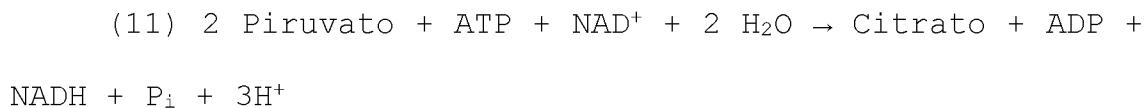
[00140] A integração das modificações de acordo com a invenção torna possível fixar 1,2 moléculas de carbono adicionais por mol de glicose consumida. O rendimento teórico

máximo correspondente é de 1,17 g_{piruvato}/g_{glicose}, o que representa uma melhoria de cerca de 20% em comparação com o rendimento de fixação de carbono da glicólise.

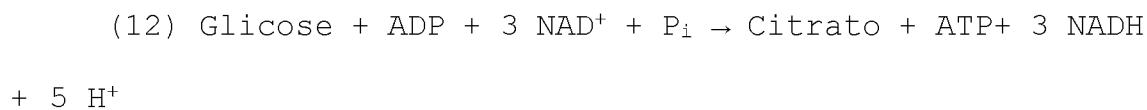
ii) Aplicação para a produção de citrato

[00141] Em um segundo caso, o cálculo é aplicado à produção de citrato na levedura *S. cerevisiae*, em uma cepa do tipo selvagem e em uma cepa modificada de acordo com a invenção incorporando engenharia PRK/RuBisCO e deletada para o gene PGK1 de forma a inibir a via glicólise, e para o gene ZWF1 inibir a ramificação oxidativa da via das pentoses.

[00142] A produção de citrato a partir de piruvato é resumida pela seguinte equação de balanço:



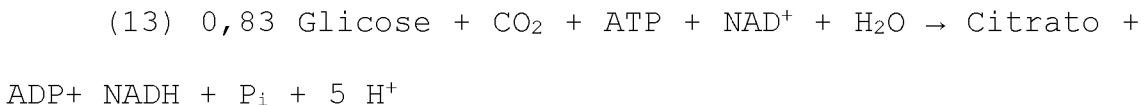
[00143] Esta síntese não requer NADPH, mas 2 moles de piruvato. Idealmente, uma cepa do tipo selvagem obtém estes 2 moles de piruvato por glicólise, a partir de um mol de glicose de acordo com a equação (4), com o seguinte equilíbrio:



[00144] O rendimento g_{citrato}/g_{glicose} correspondente é de 1,07.

[00145] No contexto de uma cepa modificada de acordo

com a invenção, inibida pela via da glicólise e pela via das pentose-fosfato, os 2 piruvatos requeridos são obtidos com apenas 0,83 mol de glicose (ver equação 9), com o seguinte equilíbrio:



[00146] O rendimento correspondente de g_{citrato}/g_{glicose} é de 1,28, um aumento teórico máximo de cerca de 20% comparado com o rendimento da cepa do tipo selvagem.

c) Simulação dos rendimentos de biossíntese por análise de balanço de fluxo

[00147] Em uma abordagem de bioinformática, análises de balanço de fluxo (FBAs) também foram realizadas para simular o impacto das modificações descritas de acordo com a invenção no rendimento de diferentes vias biossintéticas.

[00148] As FBAs baseiam-se em modelos matemáticos que simulam redes metabólicas na escala do genoma (Orth et al., Nat Biotechnol. 2010; 28: 245-248). As redes reconstruídas contêm as reações metabólicas conhecidas de um determinado organismo e integram as necessidades da célula, em particular para garantir a manutenção ou o crescimento das células. As FBAs permitem calcular o fluxo de metabólitos através dessas redes, possibilitando a previsão de taxas teóricas de crescimento e de produção de metabólitos.

i) Procedimento

[00149] Simulações de FBA foram realizadas com o software OptFlux (Rocha et al., BMC Syst Biol. 2010, 19 de abril; 4: 45. doi: 10.1186/1752-0509-4-45), e o modelo metabólico de *Saccharomyces cerevisiae* iMM904 (Mo et al., BMC Syst Biol. 2009 Mar 25; 3: 37 doi: 10.1186/1752-0509-3-37). Este modelo foi modificado para incluir as melhorias descritas de acordo com a invenção, incluindo uma via de fixação de CO₂ heteróloga com (i) a adição de uma reação do tipo PRK, (ii) a adição de uma reação do tipo RuBisCO.

[00150] Em modalidades exemplificativas particulares, as reações necessárias para simular a produção de moléculas através de vias heterólogas também foram adicionadas ao modelo.

[00151] Em uma modalidade exemplificativa particular, foi adicionada uma reação de farneseno sintase (EC 4.2.3.46 ou EC 4.2.3.47) para a produção heteróloga de farneseno.

[00152] Em uma segunda modalidade exemplificativa particular, as reações de acetoacetil-CoA redutase (EC 1.1.1.36) e poli-hidroxibutirato sintase (EC 2.3.1.B2 ou 2.3.1.B5) foram adicionadas ao modelo para simular uma via de produção heteróloga de β -hidroxibutirato, o monômero de poli-hidroxibutirato.

[00153] Em outra modalidade exemplificativa particular, foi adicionada uma reação de glutamato descarboxilase (EC 4.1.1.15) para a produção heteróloga do

ácido γ -aminobutírico.

[00154] Em outra modalidade exemplificativa particular, foi adicionada uma reação de aconitato descarboxilase (EC 4.1.1.6) para a produção heteróloga de ácido itacônico.

[00155] Em outra modalidade exemplificativa particular, foi adicionada uma reação de lactato desidrogenase (EC 1.1.1.27) para a produção heteróloga de oxalato.

[00156] As simulações foram realizadas aplicando ao modelo um conjunto de restrições reproduzíveis pela pessoa habilitada, destinadas a simular as condições de cultura *in vivo* de uma cepa de *S. cerevisiae* sob as condições descritas de acordo com a invenção (por exemplo, presença de glicose não restrita no meio, condição de cultura aeróbica).

[00157] Em modalidade particulares exemplares, são realizadas simulações por praticamente inativando as reações de enzimas de PGK1 (por exemplo, glutamato, ácido β -hidroxibutírico, farneseno) e ZWF1 (por exemplo, a produção de citrato), a fim de simular as diminuições na atividade de glicólise e a via de pentose-fosfato, descrita de acordo com a invenção.

[00158] Simulações são realizadas em paralelo em um modelo de "tipo selvagem" não modificado, a fim de avaliar o impacto das melhorias descritas de acordo com a invenção

sobre o rendimento de produção das vias bioassintéticas testadas.

ii) Resultados

[00159] Os rendimentos teóricos obtidos e as percentagens de melhoria proporcionadas pela invenção são descritos na Tabela 11 abaixo.

Tabela 11: Rendimentos teóricos máximos de produção avaliados por FBA em uma cepa do tipo selvagem e uma cepa modificada de acordo com as modificações da patente, para a produção de diferentes moléculas.

Molécula alvo	Condições de simulação	Produção máxima de produção teórica com uma cepa do tipo selvagem			Produção máxima teórica com uma cepa modificada de acordo com a invenção			Melhoria percentual na eficiência de massa teórica fornecida pela invenção
		Mol _X /Mol	CMol _X /CMo	g _X /g _G	Mol _X /Mol	CMol _X /CMo	g _X /g _G	
		GLUC	1-GLUC	LUC	GLUC	1-GLUC	LUC	
Citrato	ΔPGK1, ΔZWF1,	1	1	1,07	1,2	1,2	1,28	+ 20 %
Itaconato	ΔPGK1, ΔZWF1,	1	0,83	0,72	1,2	1	0,87	+ 20 %
Glutamato	ΔPGK1	0,92	0,77	0,75	1,09	0,91	0,89	+ 18,7 %
	ΔPGK1, ΔZWF1,	1	0,83	0,82	1,2	1	0,98	+ 20 %

GABA	$\Delta PGK1, \Delta ZWF1,$	1	0,67	0,57	1,2	0,8	0,69	+20 %
ácido β -Hidroxibutírico	$\Delta PGK1$	0,92	0,61	0,53	1,09	0,73	0,63	+ 18,2 %
Farneseno	$\Delta PGK1$	0,21	0,54	0,24	0,24	0,59	0,27	+12,5 %
Coprodução - Succinato - oxalato	$\Delta PGK1, \Delta ZWF1,$	1	0,67	0,66	1,2	0,8	0,79	+20 %
		1	0,33	0,5	1,2	0,4	0,6	+20 %

[00160] Mol_X/Mol_{GLUC} : moles da molécula X produzidos, em relação aos moles de glicose consumidos

[00161] $CMol_X/CMol_{GLUC}$: moles de carbono da molécula X produzidas, em relação aos moles de carbono de glicose consumidos

[00162] g_X/g_{GLUC} : g da molécula X produzida, em relação à g de glicose consumida.

Exemplo 2: Melhoria da produção de farneseno em *S. cerevisiae*

[00163] Uma cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae*, CEN.PK 1605 (Mat a HIS3 leu2-3,112 trp1-289 ura3-52 MAL.28c) derivada da cepa comercial CEN.PK 113-7D (GenBank: JRRV00000000) foi projetada para produzir NADPH sem perda de CO_2 e assim permitir a melhoria da produção de alfa-farneseno a partir da glicose.

a) Inativação da via da glicólise

[00164] Para esse fim, a via da glicólise foi

inativada pela deleção do gene PGK1. Uma vez que a glicólise é inibida, a cepa de levedura resultante não é mais capaz de usar glicose como fonte de carbono e energia. Por conseguinte, é necessário fornecer as vias de síntese de biomassa com glicerol e as vias de energia com etanol. As cepas nas quais PGK1 é deletado são cultivadas em meio YPGE (extrato de levedura peptona glicerol etanol).

[00165] A deleção do gene PGK1 foi obtida da seguinte forma:

[00166] A fase de codificação do gene de resistência G418, derivado do cassete KanMX contida no plasmídeo pUG6 (P30114 - Euroscarf), foi amplificada com os oligonucleotídeos CB101 (SEQ ID NO: 1) e CB102 (SEQ ID NO: 2):

SEQ ID NO: 1: CB101 (frente): 5'-
ACAGATCATCAAGGAAGTAATTATCTACTTTACAACAAATATAAAACAATGGGTAAG
GAAAAGACTCACGTTTC -3'

SEQ ID NO: 2: CB102 (reverso): 5'-
GGGAAAGAGAAAAGAAAAAAATTGATCTATCGATTCAATTCAATTCAATTAGAAAAA
CTCATCGAGCATCAAATGAAAC-3'

[00167] A porção sublinhada dos oligonucleotídeos é perfeitamente homóloga à sequência de Kan e o restante da sequência às regiões adjacentes à fase de codificação do gene PGK1 no genoma de *Saccharomyces cerevisiae* para gerar um amplicon de PCR contendo em suas terminações sequências

de recombinações homólogas do locus do Gene PGK1.

[00168] Para a reação de transformação de acordo com o perito (Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor manual do curso de laboratório, 1997; Gietz e Schiest, 1995, Methods in Molecular and Cellular Biology 5 [5]: 225-269), a cepa CEN.PK 1605 foi cultivada em um volume de 50 ml de complexo rico em meio YPD (extrato de levedura peptona dextrose) a 30 °C até uma densidade ótica a 600 nm de 0,8. As células foram centrifugadas durante 5 minutos a 2.500 rpm à temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e as células foram ressuspensas em 25 ml de água estéril e novamente centrifugadas durante 5 minutos a 2.500 rpm à temperatura ambiente. Após a remoção do sobrenadante, as células foram ressuspensas em 400 µl de acetato de lítio 100 mM estéril.

[00169] Ao mesmo tempo, uma mistura de transformação foi preparado em um tubo de 2 mL da seguinte forma: 250 µL de PEG 50%, 10 µL de DNA "carreador" a 5 mg/mL, 36 µL de acetato de lítio 1 M, 5 ou 10 µL de reação de PCR purificada (cassete de deleção) e 350 µL de água.

[00170] As células ressuspensas (50 µL) foram adicionadas à mistura de transformação e incubadas a 42 °C por 40 minutos em banho-maria.

[00171] Após incubação, o tubo foi centrifugado durante 1 minuto a 5.000 rpm à temperatura ambiente e o

sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas em 2 mL de meio YPGE (extrato de levedura de peptona de glicerol etanol), transferida para um tubo de 14 mL e incubado durante 2 horas a 30 °C a 200 rpm. As células foram então centrifugadas durante 1 minuto a 5.000 rpm à temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e as células foram ressuspensas em 1 mL de água esterilizada e novamente centrifugadas durante 1 minuto e ressuspensas em 100 mL de água esterilizada e espalhadas sobre 180 µg/mL YPGE + G418.

[00172] As colônias obtidas foram genotipadas para a validação da deleção do gene PGK1 e referenciadas por EQ-0134 (CEN.PK1605 Δpgk1 :: kan).

b) Introdução das enzimas PRK - RuBisCO - alfa-farneseno sintase

[00173] A fim de reconstituir uma via alternativa à glicólise e permitir que a cepa Δpgk1 cresça sobre a glicose, a referida cepa foi modificada para permitir a expressão combinatória de:

[00174] • um gene que codifica um PRK de fosforibulokinase que é enxertado na via das pentose-fosfato, consumindo a ribulose-5P para dar a ribulose-1,5bisP e

[00175] • um RuBisCO do tipo I (com os genes estruturais RbcL e RbcS e as chaperonas RbcX, GroES e GroEL).

RuBisCO consome ribulose-1,5bisP e um mol de CO₂ para formar 3-fosfoglicerato a jusante da deleção de PGK1 na via da glicólise.

[00176] Esse caminho alternativo permite novamente que a cepa consuma glicose como sua principal fonte de carbono e energia.

[00177] Para produzir o alfa-farneseno, o fermento não possui o gene alfa-farneseno sintase (AFS1; SEQ ID NO: 71; número de acesso do GenBank AY182241).

[00178] Além disso, os sete genes necessários para a engenharia de PRK-RuBisCO (Tabela 12) foram clonados em quatro vetores plasmídeos capazes de replicação autônoma, com origens de replicação compatíveis e cada um carreando um gene diferente para complementação de auxotrofia ou resistência a antibióticos, permitindo a seleção de cepas contendo as três ou quatro construtos de plasmídeos.

[00179] Dois destes plasmídeos são de cópia única, com uma origem de replicação Ars/CEN e o terceiro é multicópia com uma origem de 2μ.

Tabela 12: Descrição dos cassetes de expressão e composição do plasmídeo

	GenBank	Otimização de códon	Promotor	Terminador	ori	Marcador auxotrófico	Plasmídeos		
RbcL	BAD78320 .1	Sim	TDH3p	ADH1t	2μ	URA3	pFPP45		

RbcS	BAD78319 .1	Sim	TEF1p	PGK1t	2μ	URA3	pFPP45		
RbcX	BAD80711 .1	Sim	TEF1p	PGK1t	ARS- CEN6	LEU2	pFPP56		
GroES	U00096	Não	PGI1p	CYC1t	ARS- CEN6	LEU2	pFPP56		
GroEL	AP009048	Não	TDH3p	ADH1t	ARS- CEN6	LEU2	pFPP56		
PRK	BAD78757 .1	Sim	Tet-OFF	CYC1t	ARS416 -CEN4	TRP1	pFPP20		
alfa- farnese no sintase (AFS1)	AY182241	Sim	TEF1p	PGK1t	2μ	NatMX		pL 4	
Vazio			Tet-OFF	CYC1t	ARS416 -CEN4	TRP1	pCM185		
Vazio					ARS- CEN6	LEU2	pFL36		
Vazio			TEF1p	PGK1t	2μ	URA3	pV51TE F		

[00180] Os genes de *Synechococcus elongatus* tais como *rbcL*, *rbcS*, *rbcX* e *prk* (como descrito em WO 2015107496 A1) e alfa-farneseno sintase de *Malus domestica* (Tippmann et al., Biotechnol Bioeng. 2016 Jan; 113 (1): 72-81) foram otimizados para o uso de códons em levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

[00181] De acordo com o protocolo anteriormente descrito para transformação de levedura, a cepa EQ-0134 foi cultivada em um volume de 50 mL de meio rico complexo YPGE (peptona-etanol extrato de levedura glicerol) a 30 °C. As

células são centrifugadas durante 5 minutos a 2.500 rpm à temperatura ambiente. O sobrenadante é removido e as células são ressuspensas em 25 ml de água estéril e novamente centrifugadas durante 5 minutos a 2.500 rpm à temperatura ambiente. Depois de remover o sobrenadante, as células são ressuspensas em 400 µL de acetato de lítio estéril 100 mM. Ao mesmo tempo, a seguinte mistura de transformação é preparada: 250 µL de PEG 50%, 10 µL de DNA "carreador" a 5 mg/mL, 36 µL de acetato de lítio 1 M, 10 µL (3 µg de uma das seguintes combinações, pFPP45 + pFPP56 + pFPP20 ou pL4 + pFPP45 + pFPP56 + pFPP20) e 350 µL de água.

[00182] As células ressuspensas (50 µL) foram adicionadas à mistura de transformação e incubadas a 42 °C por 40 minutos em banho-maria. Após incubação, o tubo foi centrifugado durante 1 minuto a 5.000 rpm à temperatura ambiente e o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas em 2 mL de YNB (base de nitrogênio de levedura incluindo sulfato de amônio) com glicerol e etanol, transferidas para um tubo de 14 mL e incubadas durante 2 horas a 30 °C sob atmosfera enriquecida com 10% de CO₂. A mistura final é espalhada em meio ágar YNB incluindo sulfato de amônio + CSM sem LUW (uracila leucina, triptofano) + nourseotricina, se aplicável, com glicerol e etanol como fontes de carbono.

[00183] De acordo com o protocolo anteriormente

descrito, a cepa CEN.PK 1605 é transformada com a seguinte combinação de plasmídeos: pL4 + pFL36 + pCM185 + pV51TEF.

[00184] Os clones obtidos foram genotipados para todos os genes de engenharia e depois adaptados em meio líquido YNB sulfato de amônio e glicose.

- EQ-0153 (CEN.PK1605 Δpgk1:: kan) (pFPP45 + pFPP56 + pFPP20)
- EQ-0253 (CEN.PK1605 Δpgk1:: kan) (pL4 + pFPP56 + pFPP20 + pFPP45)
- EQ-0353 (CEN.PK1605) (pL4 + pFL36 + pCM185 + pV51TEF)

c) *Adaptação das cepas EQ-0153 e EQ-0253 ao crescimento em meio líquido com glicose e CO₂.*

[00185] Culturas em banho maria em frascos Erlenmeyer são realizadas com o meio de cultura apropriado e um fornecimento de CO₂ exógeno a 10%, em incubadora com agitação (120 rpm, 30°C), com inoculação a 0,05 DO 600 nm medida usando um espectrofotômetro EON (BioTek Instrumentos). A cepa de interesse é cultivada em meio YNB + CSM-LUW com 10 g/L de glicerol e 7,5 g/L de etanol, sob condições em que a expressão de PRK não é induzida, e na presença de nourseotricina, se apropriado. Sob estas condições, é necessário alimentar a cepa antes e após a deleção do gene PGK1.

[00186] Após a obtenção de uma quantidade suficiente de biomassa, culturas com volume maior ou igual a 50 mL em

frascos Erlenmeyer de pelo menos 250 mL são inoculadas para adaptar a deformação ao uso da engenharia PRK/RuBisCO. Esta adaptação é realizada em meio de cultura YNB + CSM-LUW com 20 g/L de glicose, na presença de nourseotricina, se necessário, e um suprimento de CO₂ exógeno, conforme descrito acima.

[00187] Após observação de um inicio de crescimento significativo, as cepas são adaptadas a um meio mineral mínimo livre dos aminoácidos e bases nitrogenadas incluídas no CSM-LUW, ou seja, apenas YNB com 20 g/L de glicose, nourseotricina se necessário e uma oferta exógena de CO₂ como descrito acima.

d) Produção de farneseno em frascos Erlenmeyer

[00188] A cepa EQ-0253 de *Saccharomyces cerevisiae*, com uma deleção na via glicolítica no gene PGK1, é cultivada para produzir farneseno enquanto superproduz NADPH sem perda de CO₂, utilizando um PRK e um RuBisCO.

[00189] Esta cepa de interesse é comparada com uma cepa de referência EQ-0353 produzindo farneseno após a introdução de uma alfa-farneseno-síntase heteróloga, sem deleção de PGK1 ou adição de PRK e RuBisCO.

[00190] As cepas EQ-0253 (CEN.PK1605 Δpgk1 :: kan) (pL4 + pFPP56 + pFPP20 + pFPP45) e EQ-0353 (CEN.PK1605) (pL4 + pFL36 + pCM185 + pV51TEF) cresceram em um meio YNB com 20 g/L de D -glicose, à qual foi adicionado 100 µg/L de

nourseotricina. Uma pré-cultura contendo 20 mL de meio de cultura foi inoculada a 0,05 OD_{600nm} em um frasco Erlenmeyer de 250 mL, agitado a 120 rpm durante 24 h a 30 °C em uma incubadora Minitron com uma atmosfera regulada a 10% de CO₂. A partir da primeira pré-cultura, 50 mL de meio foram inoculados a 0,05 de OD_{600nm} em Erlenmeyer de 250 mL e agitados a 120 rpm durante 24 h a 30 °C, 10% de CO₂. A cultura, também conduzida em frascos Erlenmeyer (500 mL, confundidos) da segunda pré-cultura, foi inoculada a 0,05 OD_{600nm} em 100 mL do mesmo meio de cultura, ao qual 50 µg/mL de ampicilina, 10 µL de antiespuma (Antiespuma 204, Sigma, A6426) e 10% (v/v) de dodecano (Tippman et al., Talanta (2016), 146: 100-106). As culturas foram agitadas a 120 rpm a 30 °C na presença de 10% de CO₂. O crescimento foi monitorizado medindo a turbidez a 600 nm.

[00191] Para extrair farneseno, 500 µL de fase orgânica foram coletados e centrifugados a 5.000 g por 5 min para a separação completa das duas fases. A fase orgânica foi armazenada a 4 °C até a análise por GC-MS. A detecção e quantificação do α-farneseno foi realizada por espectrometria de massa de quadrupolo único. Utilizou-se uma coluna Zebron ZB-FFAP com hidrogênio como gás transportador a uma taxa fixa de 2,95 mL/min. A temperatura de entrada foi de 260 °C, 1 µL da amostra foi injetada no modo sem divisão. A temperatura inicial do forno foi de 70 °C (4 min) e depois

foi gradualmente aumentada para 160 °C (7/min) e depois para 240 °C (40/min) onde foi mantida durante 1,05 min. Para a detecção por espectrometria de massa, as temperaturas da linha de transferência e da fonte foram de 250 °C e 200 °C, respectivamente. A aquisição de massa foi feita entre t = 10 min e t = 20 min. Uma calibração externa incluindo sete pontos foi realizada usando a mistura de isômeros de farneseno (Sigma, W383902) para a quantificação de α -farneseno produzido pelas cepas.

[00192] Para quantificar a glicose consumida pelas cepas, foram coletados 500 μ L de meio de cultura no mesmo OD de extração de farneseno, centrifugado a 5.000 g, 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi filtrado (Minicart RC4, Sartorius 0,45 μ m) e armazenado em um frasco a -20 °C. A glicose contida nesta amostra foi quantificada por UltiMate 3000 HPLC-UV (Thermo Scientific) equipado com uma bomba, um auto-amostrador refrigerado a 8 °C e um detector de índice de refração (RI) (Precision Instruments IOTA 2). Uma coluna de Rezex ROA- ácido orgânico H + (8%) de 150 x 7,8 mm, 8 μ m de tamanho de partícula (Phenomenex, 00H-0138-KO) foi usado com um Carbo-H pré-coluna de 4 x 3,0 mm. A temperatura da coluna foi de 35 °C e o caudal foi estabelecido em 0,5 ml/min. A eluição isocrática foi realizada com uma fase móvel aquosa a 5 mM de H_2SO_4 e durou 30 min. Um volume de 20 μ L foi injetado para cada amostra. A identificação dos compostos

foi baseada na comparação dos tempos de retenção com os padrões. A calibração externa inclui 10 pontos de concentração de glicose variável (0-20 g/L).

[00193] O rendimento de carbono $Y_{\alpha\text{-farneseno}/\text{Glc}}$ é calculado em gramas de farneseno produzido por grama de glicose consumida para ambas as cepas EQ-0253 e EQ-0353,

$$Y_{\alpha\text{-farneseno}/\text{Glc}} = \frac{\text{farneseno(mg/L aquoso)}}{\text{glicose(mg/L aquoso)}}.$$

Tabela 13: Rendimento em massa de α -farneseno para D-glicose

Cepas	$Y_{\alpha\text{- farneseno /glicose}} \times 10^{-4}$ (g/g)	Melhoria de rendimento
EQ-0253	12,5	+ 9,6%
EQ-0353	11,4	

[00194] O aumento no rendimento em massa do α -farneseno para D-glicose observado foi de 9,6% para a cepa EQ-0253, comparado com a cepa de controle EQ-0353.

Exemplo 3: Melhoria da produção de citrato em *S. cerevisiae*

a) Inativação do gene *ZWF1* e do gene *IDH1* em uma cepa haploide do tipo *MAT a*

[00195] • Inativação do gene *ZWF1*

[00196] A fase de codificação do gene de resistência B higromicina, derivada a partir do cassete hphMX (loxP-pAgTEF1-hph-tAgTEF1-loxP) e contido no plasmídeo pUG75

(P30671) - Euroscarf), é amplificado com os oligonucleotídeos Sdzwf1 e Rdzwf1 (Tabela 14). Isto faz com que seja possível gerar um amplicon de PCR contendo Δ zwf1 nas suas extremidades sequências de recombinação homóloga do locus do gene ZWF1 desidrogenase de glicose-6-fosfato.

Tabela 14: Oligonucleotídeos

Nome	Sequência
Sdzwf1 (SEQ ID NO: 3)	AAGAGTAAATCCAATAGAATAGAAAACCACATAAGGCAAGAT <u>GGGTAAAAAG</u> <u>CCTGAACTCACCG</u>
Rdzwf1 (SEQ ID NO: 4)	ATTCAGTGACTTAGCCGATAATGAATGTGCTGCATT <u>TTTATTCC</u> <u>GCCCTCGGACG</u>
Sdpgk1 (SEQ ID NO: 5)	ACAGATCATCAAGGAAGTAATTATCTACT <u>TTTACAACAAATATAAAACAAT</u> <u>GGGTAAGGAAAAGACTCACGTTTC</u>
Rdpgk1 (SEQ ID NO: 6)	<u>GGGAAAGAGAAAAGAAAAAAATTGATCTATCGATTCAATTCAATTCAATT</u> <u>AGAAAAACTCATCGAGCATCAAATGAAAC</u>
Sdihd1 (SEQ ID NO: 7)	TCTCCCTATCCTCATTCTTCTCCCTTCCATAATT <u>GTAAGAGAAAAAT</u> <u>GGGTACCACTCTGACGACACGG</u>

Rdidh1 (SEQ ID NO: 8)	AATTTGAACACACTTAAGTTGCAGAACAAAAAAAAGGGGAATTGTTTCATT <u>AGGGGCAGGGCATGCTCATGTAGAGC</u>
-----------------------------	--

[00197] A porção sublinhada dos oligonucleotídeos corresponde à porção perfeitamente homóloga à sequência do gene de seleção, o resto da sequência corresponde às regiões adjacentes à fase de codificação do gene alvo a ser eliminado no genoma de *Saccharomyces cerevisiae*.

[00198] A cepa CEN.PK 1605 descrita anteriormente (Mat a HIS3 leu2-3.112 trp1-289 ura3-52 MAL.28c) derivada da cepa comercial CEN.PK 113-7D (GenBank: JRIV00000000) é transformada com o fragmento de PCR Δzwf1 descrito acima.

[00199] Para a reação de transformação, a cepa CEN.PK 1605 cultivada em um volume de 50 mL de meio rico complexo YPD (peptonato de extrato de levedura dextrose, aqui 20 g/L glicose) a 30 °C a uma densidade ótica a 600 nm de 0,8. As células são centrifugadas durante 5 minutos a 2.500 rpm à temperatura ambiente. O sobrenadante é removido e as células são ressuspensas em 25 ml de água estéril e novamente centrifugadas durante 5 minutos a 2.500 rpm à temperatura ambiente. Depois de remover o sobrenadante, as células são ressuspensas em 400 µL de acetato de lítio estéril 100 mM.

[00200] Ao mesmo tempo, uma mistura de transformação é preparada em um tubo de 2 mL como segue: 250 µL de PEG

50%, 10 μ L de DNA "carreador" a 5 mg/mL, 36 μ L de acetato de lítio 1 M, 10 μ L de Reação de PCR purificada (cassete de deleção) e 350 μ L de água.

[00201] As células ressuspensas (50 μ L) são adicionadas à mistura de transformação e incubadas a 42 °C por 40 minutos em banho-maria. Após a incubação, o tubo é centrifugado durante 1 minuto a 5.000 rpm à temperatura ambiente e o sobrenadante é descartado. As células são ressuspensas em 2 mL de meio YPD (extrato de levedura peptona dextrose), transferidas para um tubo de 14 mL e incubadas durante 2 horas a 30 °C a 200 rpm. As células são então centrifugadas durante 1 minuto a 5.000 rpm à temperatura ambiente. O sobrenadante é removido e as células são ressuspensas em 1 mL de água estéril e centrifugou-se novamente durante 1 minuto e ressuspensas em 100 μ L de água estéril e espalhadas em YPD + higromicina B (200 μ g/mL).

[00202] As colônias obtidas foram genotipadas para a validação da deleção do gene ZWF1 e referenciadas ao EQSC-002 (CEN.PK 1605 Δ zwf1 :: hph).

- Inativação do gene *IDH1*

[00203] A inativação deste gene permite o acúmulo de citrato (Rodriguez et al, *Microb Cell Fact.* 2016 Mar 3; 15: 48).

[00204] A fase de codificação do gene de resistência nourseotricina, derivada a partir do cassete natMX (loxP-

pAgTEF1-nat-tAgTEF1-loxP) contido no plasmídeo (pUG74 (P30670) - Euroscarf) é amplificado com os oligonucleotídeos Sdih1 e Rdih1 (Tabela 13). Isto faz com que seja possível gerar um amplicon de PCR contendo *Δidh1* nas suas extremidades das sequências de recombinação homóloga do locus do gene da subunidade IDH1 de isocitrato desidrogenase.

[00205] As cepas anteriormente descritas, EQSC-002 (CEN.PK 1605 *Δzwf1 :: hph*) e CEN.PK 1605 (Mat a HIS3 leu2-3.112 trp1-289 ura3-52 MAL.28c) derivaram da cepa comercial CEN.PK 113 -7D (GenBank: JRIV00000000) são transformadas com o fragmento de PCR para inativação do gene IDH1.

[00206] Para a reação de transformação, as cepas EQSC-002 e CEN.PK1605 são cultivadas em um volume de 50 mL de meio rico complexo YPD (extrato de levedura peptona dextrose, aqui 20 g/L de glicose) a 30 °C até uma densidade ótica a 600 nm de 0,8. As células são centrifugadas durante 5 minutos a 2.500 rpm à temperatura ambiente. O sobrenadante é removido e as células são ressuspensas em 25 ml de água estéril e novamente centrifugadas durante 5 minutos a 2.500 rpm à temperatura ambiente. Depois de remover o sobrenadante, as células são ressuspensas em 400 µL de acetato de lítio estéril 100 mM.

[00207] Ao mesmo tempo, uma mistura de transformação é preparada em um tubo de 2 mL da seguinte forma: 250 µL de PEG 50%, 10 µL de DNA "carreador" a 5 mg/mL, 36 µL de acetato

de lítio 1 M, 10 µL de Reação de PCR purificada (cassete de deleção) e 350 µL de água.

[00208] As células ressuspensas (50 µL) são adicionadas à mistura de transformação e incubadas a 42 °C por 40 minutos em banho-maria. Após a incubação, o tubo é centrifugado durante 1 minuto a 5.000 rpm à temperatura ambiente e o sobrenadante é descartado. As células são de novo suspensas em 2 mL de meio YPD (extrato de levedura de peptona dextrose), transferido para um tubo de 14 mL e incubado durante 2 horas a 30 °C a 200 rpm. As células são então centrifugadas durante 1 minuto a 5.000 rpm à temperatura ambiente. O sobrenadante é removido e as células são ressuspensas em 1 mL de água estéril e centrifugou-se novamente durante 1 minuto e ressuspensas em 100 µl de água estéril e espalhadas em YPD + higromicina 200 µg/ml, 50 µg/mL de nourseotricina.

[00209] As colônias obtidas foram genotipadas para a validação da deleção do gene IDH1 e são denominadas EQSC-003 (CEN.PK 1605 Δzwf1 :: hph, Δidh1 :: nat) e EQSC-005 (CEN.PK 1605 Δidh1 :: nat)

b) Inativação do gene PGK1 em uma cepa haplóide do tipo MAT alf

[00210] A fase de codificação do gene de resistência G418 do cassete KanMX (loxP-pAgTEF1-kanMX-tAgTEF1-loxP) contida no plasmídeo pUG6 (P30114) - Euroscarf é amplificada

com os oligonucleotídeos Sdpgk1 e Rdpgk1 (Tabela 13) para gerar um amplicon de PCR Δpgk1 contendo nas suas extremidades sequências de recombinação homóloga do locus do gene PGK1 de 3-fosfoglicerato quinase.

[00211] A cepa CEN.PK 1606 (Mat alfa HIS3 leu2-3.112 trp1-289 ura3-52 MAL.28c) derivada da cepa comercial CEN.PK 113-7D (GenBank: JRIV00000000) é transformada com o fragmento de PCR para inativação do gene PGK1.

[00212] Para a reação de transformação, a cepa CEN.PK 1606 cultivada em um volume de 50 mL de complexo rico em YPD (Extrato de levedura de peptona dextrose, aqui 20 g de glicose/L) a 30 °C até uma densidade ótica a 600 nm de 0,8. As células são centrifugadas durante 5 minutos a 2.500 rpm à temperatura ambiente. O sobrenadante é removido e as células são ressuspensas em 25 ml de água estéril e novamente centrifugadas durante 5 minutos a 2.500 rpm à temperatura ambiente. Depois de remover o sobrenadante, as células são ressuspensas em 400 µL de acetato de lítio estéril 100 mM.

[00213] Ao mesmo tempo, uma mistura de transformação é preparada em um tubo de 2 mL da seguinte forma: 250 µL de PEG 50%, 10 µL de DNA "carreador" a 5 mg/mL, 36 µL de acetato de lítio 1 M, 10 µL de Reação de PCR purificada (cassete de deleção) e 350 µL de água.

[00214] As células ressuspensas (50 µL) são adicionadas à mistura de transformação e incubadas a 42 °C

por 40 minutos em banho-maria. Após a incubação, o tubo é centrifugado durante 1 minuto a 5.000 rpm à temperatura ambiente e o sobrenadante é descartado. As células são ressuspensas em 2 mL de YPGE (peptona de extrato de levedura 20 g/L glicerol, 30 g/L de etanol), transferidas para um tubo de 14 mL e incubadas durante 2 horas a 30 °C a 200 rpm. As células são então centrifugadas durante 1 minuto a 5.000 rpm à temperatura ambiente. O sobrenadante é removido e as células são ressuspensas em 1 mL de água estéril e centrifugou-se novamente durante 1 minuto e ressuspensas em 100 µl de água esterilizada e espalhou sobre YPGE + 150 µg/mL de G418.

[00215] As colônias obtidas foram genotipadas para a validação da deleção do gene PGK1 e referenciadas pelo EQSC-008 (CEN.PK 1605, Δpgk1:: kan).

c) Construção de uma cepa na qual o IDH1, ZWF1 e PGK1 foram inativados pelo cruzamento

[00216] As cepas haploides dos tipos de cruzamento oposto EQSC-003 (CEN.PK 1605 Δzwf1 :: hph, Δidh1 :: nat) e EQSC-008 (CEN.PK 1606 Δpgk1 :: kan) são cultivadas durante a noite em meio ágar: YPD (extrato de levedura peptona dextrose) para a cepa EQSC-008 e YPGE (extrato de levedura peptona glicerol etanol) para a cepa EQSC003, a 30 °C. Em seguida, as duas cepas são cruzadas por contato direto em meio YPGE (extrato de levedura peptona glicerol etanol) +

150 µg/mL G418 + 200 µg/mL higromicina B. A seleção dupla de G418 e higromicina B elimina as duas cepas parentais, apenas a MAT As cepas diploides alfa/MAT, ZWF1/Δzwf1 :: hph, IDH1/Δidh1 :: nat, PGK1/Δpgk1 :: kan crescem neste meio. Um clone diploide isolado deste cruzamento é coletado. A presença dos três cassetes Δzwf1 :: hph, Δidh1 :: nat, Δpgk1 :: kan é validada por testes de crescimento em meio ágar de YPGE (extrato de levedura peptona glicerol etanol) suplementado com 150 µg/mL de G418 ou 200 µg/mL de higromicina B ou 50 µg/mL de nourseotricina. A cepa obtida é referenciada em EQSC-009 (CEN.PK 1607, MAT a/MAT alfa, ZWF1/Δzwf1 :: hph, IDH1/Δidh1 :: nat, PGK1/Δpgk1 :: kan).

[00217] A cepa anteriormente descrita EQSC-009 (CEN.PK 1607, MATa/MAT alfa, ZWF1/Δzwf1 :: hph, IDH1/Δidh1 :: nat, PGK1/Δpgk1 :: kan) é cultivada em YPGE (extrato de levedura). meio de ágar peptona glicerol etanol) durante a noite a 30 °C. As células são então colocadas em cultura líquida em meio deficiente (meio de esporulação, acetato de potássio a 1% + leucina + uracila + triptofano) para induzir a meiose das células diploides e assim levar à formação de tétrades contendo quatro esporos haploides. As tétrades são espalhadas em meio YNB.GE (base de nitrogênio de levedura, glicerol, etanol) + leucina + uracila + triptofano + 1 g/L de ácido glutâmico + 20 mg/L de metionina + 40 mg/L de cisteína e imediatamente dissecadas (usando um

microdissetor) para isolar os esporos no mesmo meio. Os esporos são germinados durante vários dias a 30 °C. O conteúdo genético das células haploides assim obtidas é testado pelo crescimento em meio seletivo: YPGE (extrato de levedura peptona glicerol etanol) suplementado com 150 µg/mL de G418 ou 200 µg/mL de higromicina B ou 50 µg/mL de nourseotricina e seu tipo de acasalamento é testado cruzando com duas cepas de acasalamento tipo MAT a ou MAT alfa. As colônias obtidas são genotipadas para a validação da deleção dos genes PGK1, IDH1, ZWF1 e a ausência de transcritos correspondentes a esses genes é validada por PCR em tempo real após a transcrição reversa dos ácidos ribonucleicos. Uma das cepas obtidas é referente a EQSC-004 (CEN.PK 1606 MAT alfa Δzwf1 :: hph, Δidh1 :: nat, Δpgk1 :: kan)

d) Introdução das enzimas PRK-RuBisCO

[00218] Os seis genes necessários para a engenharia de PRK-RuBisCO (Tabela 15 abaixo) são clonados em três vetores plasmídeos capazes de replicação autônoma, com origens de replicação compatíveis e cada um carregando um gene diferente de complementação auxotrófica, permitindo a seleção de cepas contendo os três construtos de plasmídeos (ver WO 2015107496). Dois destes plasmídeos são de cópia única com uma origem de replicação de ARS/CEN e o terceiro é multicópia com uma origem de 2µ.

[00219] **Tabela 15: Descrição dos cassetes de**

expressão e composição do plasmídeo

	GenBank	Otimização de códon	Promotor	Terminador	ori	Marcador auxotrófico	Plasmídeos
RbcL	BAD78320.1	Sim	TDH3p	ADH1t	2μ	URA3	pFPP45
RbcS	BAD78319.1	Sim	TEF1p	PGK1t	2μ	URA3	pFPP45
RbcX	BAD80711.1	Sim	TEF1p	PGK1t	ARS-CEN6	LEU2	pFPP56
GroES	U00096	Não	PGI1p	CYC1t	ARS-CEN6	LEU2	pFPP56
GroEL	AP009048	Não	TDH3p	ADH1t	ARS-CEN6	LEU2	pFPP56
PRK	BAD78757.1	Sim	Tet-OFF	CYC1t	ARS416-CEN4	TRP1	pFPP20
Vazio			Tet-OFF		ARS416-CEN4	TRP1	pCM185
Vazio			TEF1p	PGK1t	2μ	URA3	pV51TEF
Vazio					ARS-CEN6	LEU2	pFL36

[00220] De acordo com o protocolo de transformação descrito anteriormente, a cepa **EQSC-004 (CEN.PK 1606 Δzwf1 :: hph, Δidh1 :: nat, Δpgk1 :: kan)** foi cultivada em um volume de 50 mL de meio YPGE rico complexo (levedura extrair peptona glicerol etanol) a 30 °C até uma densidade ótica a 600 nm de 0,8. As células são centrifugadas durante 5 minutos a 2.500 rpm à temperatura ambiente. O sobrenadante é removido

e as células são ressuspensas em 25 ml de água estéril e novamente centrifugadas durante 5 minutos a 2.500 rpm à temperatura ambiente. Depois de remover o sobrenadante, as células são ressuspensas em 400 µL de acetato de lítio estéril 100 mM.

[00221] Ao mesmo tempo, uma mistura de transformação é preparada em um tubo de 2 mL da seguinte forma: 250 µL de PEG 50%, 10 µL de DNA "carreador" a 5 mg/mL, 36 µL de acetato de lítio 1 M, 10 µL (3 µg) de uma combinação de pFPP45 + pFPP56 + pFPP20 e 350 µL de água.

[00222] As células ressuspensas (50 µL) são adicionadas à mistura de transformação e incubadas a 42 °C por 40 minutos em banho-maria. Após a incubação, o tubo é centrifugado durante 1 minuto a 5.000 rpm à temperatura ambiente e o sobrenadante é descartado. As células são de novo suspensas em 2 mL de YPGE (extrato de levedura de peptona de glicerol etanol) + 2 mg/L de doxiciclina, transferida para um tubo de 14 mL e incubado durante 2 horas a 30 °C a 200 rpm. As células são então centrifugadas durante 1 minuto a 5.000 rpm à temperatura ambiente. O sobrenadante é removido e as células são ressuspensas em 1 mL de água estéril e centrifugadas novamente por 1 minuto e ressuspensas em 100 mL de água estéril e espalhadas sobre YNB.GE (base de nitrogênio levedura, glicerol, etanol) + 1 g/L de ácido glutâmico + 20 mg/L de metionina + 40 mg/L de

cisteína + 2 mg/L de doxiciclina. A cepa obtida é referenciada: **EQSC-006 (CEN.PK 1606 Δzwf1 :: hph, Δidh1 :: nat, Δpgk1 :: kan) (pFPP45 + pFPP56 + pFPP20)**.

[00223] De acordo com o protocolo de transformação anteriormente descrito, a cepa **EQSC-005 (CEN.PK 1605 Δidh1 :: nat)** foi cultivada em um volume de 50 mL de meio YPGE rico complexo (peptonato de extrato de levedura glicerol etanol) a 30 °C densidade 600 nm de 0,8. As células são centrifugadas durante 5 minutos a 2.500 rpm à temperatura ambiente. O sobrenadante é removido e as células são ressuspensas em 25 ml de água estéril e novamente centrifugadas durante 5 minutos a 2.500 rpm à temperatura ambiente. Depois de remover o sobrenadante, as células são ressuspensas em 400 µL de acetato de lítio estéril 100 mM.

[00224] Ao mesmo tempo, uma mistura de transformação é preparada em um tubo de 2 mL da seguinte forma: 250 µL de PEG 50%, 10 µL de DNA "carreador" a 5 mg/mL, 36 µL de acetato de lítio 1 M, 10 µL (3 µg) de uma combinação de pV51TEF + pFL36 + pCM185 e 350 µL de água.

[00225] As células ressuspensas (50 µL) são adicionadas à mistura de transformação e incubadas a 42 °C por 40 minutos em banho-maria. Após a incubação, o tubo é centrifugado durante 1 minuto a 5.000 rpm à temperatura ambiente e o sobrenadante é descartado. As células são de novo suspensas em 2 mL de meio YPD (extrato de levedura de

peptona dextrose), transferido para um tubo de 14 mL e incubado durante 2 horas a 30 °C a 200 rpm. As células são então centrifugadas durante 1 minuto a 5.000 rpm à temperatura ambiente. O sobrenadante é removido e as células são ressuspensas em 1 mL de água estéril e novamente centrifugadas por 1 minuto e ressuspensas em 100 µL de água estéril e espalhadas em YNBD (levedura nitrogênio base dextrose) + 2 mg/L de doxiciclina. A cepa obtida é referenciada: **EQSC-007 (CEN.PK 1605 Δidh1 :: nat) (pV51TEF + pFL36 + pCM185)**.

c) Adaptação e fase de evolução das cepas EQSC-006 e EQSC-007

[00226] Adaptação das cepas **EQSC-006 e EQSC-007** ao crescimento em meio líquido YNB (base de nitrogênio de levedura) com glicose e CO₂.

[00227] Culturas em modo de lote em frascos Erlenmeyer são realizadas com o meio de cultura apropriado e um fornecimento de CO₂ exógeno a 10%, em incubadora com agitação (120 rpm, 30 °C), com inoculação a 0,05 DO 600 nm medida usando um espectrofotômetro EON (BioTek Instrumentos). A cepa de interesse é cultivada em meio YNB + CSM-LUW com 10 g/L de glicerol e 7,5 g/l de etanol, + 50 mg/l de glutamato sob condições em que a expressão de PRK não é induzida.

[00228] Após a obtenção de uma quantidade suficiente de biomassa, culturas com volume maior ou igual a 50 mL em

frascos Erlenmeyer de pelo menos 250 mL são inoculadas para adaptar a deformação ao uso da engenharia PRK/RuBisCO. Esta adaptação é realizada em meio de cultura YNB + CSM-LUW com 20 g/l de glicose, 50 mg/l de glutamato e um fornecimento de CO₂ exógeno como descrito acima.

[00229] Após observação de um início de crescimento significativo, as cepas são adaptadas a um meio mineral mínimo livre de todos os aminoácidos, exceto aqueles indicados abaixo, e bases nitrogenadas incluídas no CSM-LUW, ou seja, apenas YNB com, em concentrações finais, 20 g/L de glicose, 1 g/l de glutamato, 40 mg/L de L-cisteína e 20 mg/L de L-metionina e um fornecimento de CO₂ exógeno como descrito acima.

e) *Produção de citrato em frascos de Erlenmeyer*

[00230] A cepa **EQSC-006** de *Saccharomyces cerevisiae*, com uma deleção na via glicolítica no gene PGK1, na parte oxidativa da via das pentose-fosfato e no ciclo de Krebs, é cultivada para produzir citrato sem perda de CO₂, utilizando PRK e RuBisCO. Esta cepa de interesse é comparada com uma cepa de referência **EQSC-007** que produz citrato após inativação do gene IDH1, sem deleção de PGK1 ou ZWF1 ou adição de PRK e RuBisCO.

[00231] As cepas EQSC-006 (CEN.PK 1605 Δzwf1 :: hph, Δidh1 :: nat, Δpgk1 :: kan, pFPP45 + pFPP56 + pFPP20) e EQSC-007 (CEN.PK 1605 Δidh1 :: nat, pV51TEF + pFL36 + pCM185)

foram cultivadas em meio de base de nitrogênio de levedura (YNB) suplementado com 20 g/L de D-glicose (YNB D20).

[00232] De modo a estabelecer o citrato para os rendimentos de massa de glicose, inoculou-se uma pré- cultura contendo 20 mL de meio de cultura a 0,05 OD_{600nm} em um frasco Erlenmeyer de 250 mL, agitado a 120 rpm a 30 °C. A partir da primeira pré-cultura, inoculou-se 50 mL de meio a 0,05 de OD_{600nm} em um balão Erlenmeyer de 250 mL e agitou-se a 120 rpm, a 30 °C. A cultura foi realizada em frascos Erlenmeyer (500 mL, defasados) da segunda pré-cultura, inoculada a 0,05 OD_{600nm} em 100 mL do mesmo meio, a 30 °C, 120 rpm. O crescimento foi monitorizado medindo a turbidez a 600 nm.

[00233] Para quantificação do citrato, foram coletados 500 µL de meio de cultura, centrifugados a 5.000 g, 5 min, 4 °C. O sobrenadante foi filtrado (Minicart RC4, Sartorius 0,45 µm) e armazenado em um frasco a -20 °C antes da análise por HPLC (Thermo Scientific UltiMate 3000 HPLC) acoplada a um espectrômetro de massa de quadrupolo iônico. Cada amostra (20 µL) foi injetada em uma coluna Aminex HPX-87H H +, 300 mm x 7,8 mm (Bio-Rad, 125-0140). Uma eluição isocrática a uma taxa de fluxo de 0,5 ml/min foi realizada com uma solução aquosa de 0,037% de ácido fórmico (v/v) cujo pH foi ajustado para 4,5 com hidróxido de amônio. A temperatura do forno da coluna foi de 65°C. As condições analíticas de espectrometria de massa foram: modo de

electropulverização negativa, temperatura de fonte de 450 °C, cepa de agulha de 3 kV, cepa de cone de 50 V. Uma calibração externa de sete pontos foi realizada usando uma solução comercial de citrato de sódio.

[00234] Para quantificar a glicose consumida pelas cepas, coletaram-se 500 µL do meio de cultura, na mesma cultura, OD_{600nm}, quanto à quantificação de citrato, centrifugado a 5.000 g, 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi filtrado (Minicart RC4, Sartorius 0,45 µm) e armazenado em um frasco a -20 °C. A glicose contida nesta amostra foi quantificada por HPLC-RI UltiMate 3000 (Thermo Scientific) equipado com uma bomba, um auto-amostrador refrigerado a 8 °C e um detector de índice de refração (RI) (Precision Instruments IOTA 2). Uma coluna Rezex ROA-Acido Orgânico H + (8%) 150 x 7,8 mm, tamanho de partícula de 8 (Fenomenex, 00H-0138-KO) foi utilizada com uma pré-coluna Carbo-H 4 x 3,0 mm. A temperatura do forno da coluna foi de 35 °C e o caudal foi estabelecido em 0,5 ml/min. Uma eluição isocrática de 30 min foi realizada com uma fase móvel aquosa a 5 mM de H₂SO₄. Um volume de 20 µL foi injetado para cada amostra. A identificação dos compostos foi baseada na comparação dos tempos de retenção com os padrões. A calibração externa incluiu 10 pontos de concentração de glicose variável (0 a 20 g/L).

[00235] O rendimento em massa de Y_{citrato/Glc} foi

calculado em gramas de citrato produzido por grama de glicose consumido para ambas as cepas EQSC-006 e EQSC-007, $Y_{\text{citrato/Glc}}$

$$= \frac{\text{citrato(mg/L aquoso)}}{\text{glicose (mg/L aquoso)}} .$$

Tabela 16: Rendimento em massa, citrato para D-glicose

Cepas	$Y_{\text{citrato/glicose}} (\times 10^{-3}) \text{ (g/g)}$	Melhoria de rendimento
EQSC-006	2,1	+19,5%
EQSC-007	1,8	

[00236] Um aumento de 19,5% no rendimento de massa de citrato para a D-glicose foi observado para a cepa EQSC-006 em comparação com a cepa de controle EQSC-007.

Exemplo 4: Melhoria da produção de glutamato em *E. coli*

[00237] A deleção do gene da alfa-cetoglutarato desidrogenase aumenta a produção de glutamato (Usuda et al. J Biotechnol. 2010, 3 de maio; 147 (1): 17-30. Doi: 10.1016/j.jbiotec.2010.02.018).

[00238] Nestes exemplos, foi utilizada a cepa K12 MG1655 de *Escherichia coli* com um gene *sucA* suprimido. Esta cepa é derivada de um banco de deleção gênica (Baba et al. Mol Syst Biol. 2006; 2: 2006.0008) em *Escherichia coli* e fornecida pelo Coli Genetic Stock Center sob o nome JW0715-2 e com referência 8786. (JW0715-2 : MG1655 Δ*sucA* :: Kan).

[00239]

[00240] 4A] Melhoria da produção de glutamato por

inativação da glicólise

a) *Remoção do cassete de seleção por recombinação específica de regiões FTR por Flp recombinase*

[00241] Para poder reutilizar a mesma estratégia de deleção usada para construir a cepa JW0715-2 acima (Rodriguez et al., 2016), o cassete de seleção foi deletado usando uma recombinase.

[00242] O plasmídeo p707-Flpe (fornecido no Kit de Recombinação Quick & Easy *E. coli* Gene Deletion Red®/ET® por Gene Bridges) é transformado por eletroporação de acordo com o protocolo do kit. As células são selecionadas em LB ágar suplementado com 0,2% de glicose, 0,0003% de tetraciclina e adicionadas com 0,3% de L-arabinose. Uma contra-seleção dos clones obtidos é realizada pela verificação de que eles não são mais capazes de crescer no mesmo meio suplementado com 0,0015% de canamicina.

[00243] A cepa obtida é chamada **EQ.EC002: MG1655 ΔsucA**

b) *Deleção do operon edd-eda que codifica a via metabólica de Entner-Doudoroff*

[00244] A deleção do operon edd-eda é realizada por recombinação homóloga e o uso do Kit de Recombinação Quick & Easy *E. coli* Gene Deletion Red®/ET® (Gene Bridges) de acordo com o protocolo do fornecedor.

[00245] 1. Oligonucleotídeos projetados para amplificar um cassete de expressão do gene de resistência

FRT-PKG-gb2-neo-FRT e com uma sequência 5' homóloga de 50 nucleotídeos às regiões adjacentes do locus de eliminação, isto é, nas posições 1932065-1932115 e 1934604-1934654 no cromossomo gerando braços de recombinação do cassete no genoma bacteriano de cada lado do operon inteiro.

[00246] 2. A cepa EQ.EC002 de *Escherichia coli* K-12 é transformada por eletroporação com o plasmídeo pRedET de acordo com o protocolo do kit. As colônias obtidas são selecionadas em meio complexo rico em LB com 0,2% de glicose, 0,0003% de tetraciclina.

[00247] 3. Transformação do amplicon obtido na primeira etapa na presença de RedET recombinase, induzida por 0,3% de arabinose em LB líquido por 1 h. Para esse fim, uma segunda eletroporação das células que expressam RedET pelo cassete de deleção é realizada e as colônias são selecionadas em LB ágar suplementado com 0,2% de glicose, 0,0003% de tetraciclina e adicionadas com 0,3% de L-arabinose e 0,0015% de canamicina.

[00248] 4. O plasmídeo P707-Flpe (fornecido no Kit de Recombinação Quick & Easy *E. coli* Gene Deletion Red®/ET® (Gene Bridges) é transformado por eletroporação de acordo com o protocolo do kit. As células são selecionadas em LB ágar suplementado com 0,2% de glicose, 0,0003% de tetraciclina e adicionadas com 0,3% de L-arabinose. Uma contra-seleção dos clones obtidos é realizada pela verificação de que eles não

são mais capazes de crescer no mesmo meio suplementado com 0,0015% de canamicina.

[00249] 5. A cepa obtida é chamada **EQ.EC003: MG1655 ΔsucA Δedd-eda**

c) Deleção do gene *gapA*

[00250] A deleção do gene *gapA* é realizada por recombinação homóloga e o uso do Kit de Recombinação Quick & Easy *E. coli* Gene Deletion Red®/ET® (Gene Bridges) de acordo com o protocolo do fornecedor.

[00251] 1. Oligonucleotídeos projetados para amplificar um cassete de expressão do gene de resistência FRT-PKG-gb2-ne-FRT e tendo uma sequência 5' homóloga de 50 nucleotídeos às regiões adjacentes do locus da deleção, ou seja, a fase de codificação do gene (*gapA*) (GenBank: X02662.1) gerando assim braços de recombinação do cassete no genoma bacteriano.

[00252] 2. A cepa EQ.EC003 de *Escherichia coli* K-12 é transformada por eletroporação com o plasmídeo pRedET de acordo com o protocolo do kit. As colônias obtidas são selecionadas em meio complexo rico em LB com 0,2% de glicose, 0,0003% de tetraciclina.

[00253] 3. Transformação do amplicon obtido na primeira etapa na presença de RedET recombinase que será induzida por arabinose a 0,3% em LB líquido por 1 h. Para esse fim, é realizada uma segunda eletroporação das células

que expressam RedET pelo cassete de deleção e as colônias são selecionadas em LB ágar suplementado com 0,2% de glicerol e 0,3% de piruvato, 0,0003% de tetraciclina e adicionado com 0,3% de L-arabinose e 0,0015% canamicina.

[00254] As deleções são verificadas por genotipagem e sequenciamento e o nome das cepas obtidas é

- EQ.EC002: MG1655 Δ sucA
- EQ.EC003: MG1655 Δ sucA Δ edd-eda
- EQ.EC004: MG1655 Δ sucA Δ edd-eda Δ gapA :: kan

d) *Inserção da engenharia requerida para fixação de CO₂*

[00255] Para a expressão recombinante dos diferentes componentes de um RuBisCO do tipo I em *E. coli*, os genes descritos na Tabela 17 abaixo são clonados como um operon sintético contendo os genes descritos na Tabela 18 abaixo.

Tabela 17: Genes que codificam um sistema PRK e RuBisCO do tipo I

Genes	GenBank	Organismo
rbcL	BAD78320.1	<i>Synechococcus elongatus</i>
rbcS	BAD78319.1	<i>Synechococcus elongatus</i>
rbcX	<u>BAD80711.1</u>	<i>Synechococcus elongatus</i>

Prk	BAD78757.1	<i>Synechococcus</i> <i>elongatus</i>
-----	------------	--

Tabela 18: Composição dos cassetes de expressão

Plasmídeo	Estrutura do operon sintético no vetor pZA11								
	Gene A	RBS1	Gene B	RBS2	Gene C	RBS3	Gene D	RBS4	Gene E
pZA11									
pEQEC005	<i>rbcS</i>	D	<i>rbcL</i>	B	<i>rbcX</i>	F			
pEQEC006	<i>rbcS</i>	D	<i>rbcL</i>	B	<i>rbcX</i>	F	<i>prk</i>		
pEQEC008	<i>prk</i>								

[00256] Para controlar o nível de expressão destes genes, sequências de ligação ao ribossoma (RBS) apresentados na Tabela 19 abaixo, com as eficiências de tradução variáveis (Levin-Karp et al, Synth ACS Biol 2013 May 21; 2 (6): 327-36. doi: 10.1021/sb400002n; Zelcbuch et al, Nucleic Acids Res 2013 Maio; 41 (9): E98) são inseridos entre a fase de codificação para cada gene. A sucessão de cada fase de codificação intercalada por uma sequência de RBS é construída por inserções sucessivas em um vetor pZA11 (Expressys) que contém um promotor PLtetO-1, uma origem de replicação p15A e um gene de resistência à ampicilina.

Tabela 19: Sequências Intersticiais de RBS

Nome	Sequências RBS
A (SEQ ID NO: 9)	AGGAGGTTTGGA

B (SEQ ID NO: 10)	AACAAAATGAGGAGGTACTGAG
C (SEQ ID NO: 11)	AAGTTAAGAGGCAAGA
D (SEQ ID NO: 12)	TTCGCAGGGGGAAAG
E (SEQ ID NO: 13)	TAAGCAGGACCGGCGGCG
F (SEQ ID NO: 14)	CACCATACACTG

[00257] Várias cepas são produzidas por eletroporação dos diferentes vetores apresentados de acordo com o plano acima

EQ.EC 005 ➔ (EQ.EC 003+ pZA11): MG1655 Δ sucA Δ edd-eda

EQ.EC 006 ➔ (EQ.EC 004+ pEQEC005): MG1655 Δ sucA Δ edd-eda Δ gapA::kan (RuBisCO)

EQ.EC 007 ➔ (EQ.EC 004+ pEQEC006): MG1655 Δ sucA Δ edd-eda Δ gapA::kan (RuBisCO+PRK)

EQ.EC 009 ➔ (EQ.EC 004+ pEQEC008): MG1655 Δ sucA Δ edd-eda Δ gapA::kan (PRK)

[00258] Os clones são selecionados em meio LB suplementado com 2 g/l de glicerol e 5 g/l de piruvato e com 100 mg/L de ampicilina. Após a obtenção de uma quantidade suficiente de biomassa, culturas com um volume maior ou igual a 50 mL em um Erlenmeyer mínimo de 250 mL são inoculadas para adaptar a deformação ao uso da engenharia de PRK/RuBisCO. Esta adaptação é realizada em meio de cultura LB com glicose a 2 g/L, e um fornecimento de CO₂ exógeno a 37 °C como descrito acima.

e) *Produção de glutamato*

[00259] Para produção de glutamato, células de 500 mL de cultura LB são inoculadas em 20 mL de meio MS (40 g/L de glicose, 1 g/L de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 20 g/L de $(NH_4)_2SO_4$, 1 g/L de KH_2PO_4 , 10 mg/L de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 10 mg/L de $MnSO_4 \cdot 7H_2O$, 2 g/L de extrato de levedura, 30 g/L de $CaCO_3$, 100 mg/L de ampicilina a uma pressão de 0,1 atmosfera de CO_2 .

[00260] O glutamato residual e a glicose são medidos com um bioanalisisador (Sakura Seiki). O rendimento de carbono Yp/s é calculado em gramas de glutamato produzido por grama de glicose consumida.

[00261] Este rendimento aumenta significativamente em 10% para as cepas EQ.EC 007 (RuBisCO + PRK) em comparação com as cepas de controle EQ.EC 005 (vazio), EQ.EC 006 (apenas RuBisCO). A cepa de controle EQ.EC 009 (somente PRK) não é viável.

4B] Melhoria da produção por inativação da glicólise e da via oxidativa das pentose-fosfato

a) *Remoção do cassete de seleção por recombinação específica de regiões FTR por Flp recombinase*

[00262] Esta etapa é realizada da mesma forma que no exemplo 4A] acima.

[00263] A cepa obtida é chamada **EQ.EC002: MG1655 ΔsucA**

b) *Deleção do gene zwf*

[00264] A deleção do gene zwf (GeneID: 946370) é

realizada por recombinação homóloga e pelo uso do Kit de Recombinação Quick & Easy *E. coli* Gene Deletion Red®/ET® (Gene Bridges) de acordo com o protocolo do fornecedor, conforme detalhado no Exemplo 4A].

[00265] A cepa obtida é chamada **EQ.EC010: MG1655 ΔsucA Δzwf**

c) Deleção do gene *gapA*

[00266] A deleção do gene *gapA* na cepa EQ.EC010 de *Escherichia coli* K-12 é realizada por recombinação homóloga e o uso do Kit de Recombinação Quick & Easy *E. coli* Gene Deletion Red®/ET® (Gene Bridges) de acordo com o protocolo do fornecedor, como detalhado no Exemplo 4A].

[00267] Deleções são verificadas por genotipagem e sequenciamento e o nome das cepas obtidas é:

- EQ.EC002: MG1655 ΔsucA
- EQ.EC010: MG1655 ΔsucA Δzwf
- EQ.EC011: MG1655 ΔsucA Δzwf ΔgapA

d) Inserção da engenharia requerida para fixação de CO_2

[00268] Para a expressão recombinante dos diferentes componentes do sistema PRK funcional/RuBisCO em *E. coli*, os genes descritos na Tabela 20 e que codificam um RuBisCO do tipo I, uma fosforibuloinase, uma chaperona e uma anidrase carbônica são克lonados como um operon sintético contendo os genes descritos acima (Tabela 21).

Tabela 20: Genes que codificam um RuBisCO tipo I, uma

fosforibuloquinase e uma anidrase carbônica

Genes	GenBank	Organismo
rbcL	BAD78320.1	<i>Synechococcus elongatus</i>
rbcS	BAD78319.1	<i>Synechococcus elongatus</i>
rbcX	BAD80711.1	<i>Synechococcus elongatus</i>
Prk	BAD78757.1	<i>Synechococcus elongatus</i>
icfA	WP_011378036.1	<i>Synechococcus elongatus</i>

Tabela 21: Nomes de plasmídeos e composição do cassete de expressão

Plasmídeo	Estrutura do operon sintético no vetor pZA11								
	Gene A	RBS1	Gene B	RBS2	Gene C	RBS3	Gene D	RBS4	Gene E
pZA11									
pEQEC006	<i>rbcS</i>	D	<i>rbcl</i>	B	<i>rbcX</i>	F	<i>prk</i>		
pEQEC007	<i>rbcS</i>	D	<i>rbcl</i>	B	<i>rbcX</i>	F	<i>prk</i>	A	<i>icfA</i>

[00269] Para controlar o nível de expressão destes genes, as sequências de ligação de ribossoma (RBS) apresentadas na Tabela 17 (ver Exemplo 4A]), com eficiências de tradução variáveis (Levin-Karp et al, ACS Synth Biol 2013 May 21; 2 (6) : 327-36.doi: 10.1021/sb400002n; Zelcbuch et al., Nucleic Acids Res. 2013 May; 41 (9): e98) são inseridos entre a fase de codificação de cada gene. A sucessão de cada fase de codificação intercalada por uma sequência de RBS é

construída por inserções sucessivas em um vetor pZA11 (Expressys) que contém um promotor PLtetO-1, uma origem de replicação p15A e um gene de resistência à ampicilina. A adição de uma anidrase carbônica (icfA) também permite uma interconversão de íons de bicarbonato em moléculas de CO₂ disponíveis e melhora a eficiência de RuBisCO.

[00270] Várias cepas são produzidas por eletroporação dos diferentes vetores apresentados de acordo com o plano abaixo

EQ.EC 012 ➔ (EQ.EC 002+ pZA11) : MG1655 *ΔsucA*

EQ.EC 014 ➔ (EQ.EC 011+ pEQEC006) : MG1655 *ΔsucA Δzwf ΔgapA*
(*RuBisCO+PRK*)

EQ.EC 015 ➔ (EQ.EC 011+ pEQEC007) : MG1655 *ΔsucA Δzwf ΔgapA*
(*RuBisCO+PRK+ anidrase carbônica*)

[00271] Após a transformação, os clones são selecionados em glicerol LB, meio de piruvato suplementado com 100 mg/L de ampicilina. Uma fase de adaptação e evolução das cepas com engenharia de PRK e RuBisCO é realizada conforme descrito no Exemplo 4A].

e) *Produção de glutamato*

[00272] Para produção de glutamato, células de 500 mL de cultura LB são inoculadas em 20 mL de meio MS (40 g/L de glicose, 1 g/L de MgSO₄.7H₂O, 20 g/L de (NH₄)₂SO₄, 1 g/L de KH₂PO₄, 10 mg/L de FeSO₄.7H₂O, 10 mg/L de MnSO₄.7H₂O, 2 g/L de extrato de levedura, 30 g/L de CaCO₃, 100 mg/L de ampicilina

a uma pressão de 0,1 atmosfera de CO₂.

[00273] O glutamato residual e a glicose são medidos com um bioanalisador (YSI Inc.). O rendimento de carbono Yp/s é calculado em gramas de glutamato produzido por grama de glicose consumida.

[00274] Este rendimento aumenta significativamente em 15% para as cepas EQ.EC 014 (RuBisCO + PRK) e EQ.EC 015 (RuBisCO + PRK + anidrase carbônica) em comparação com as cepas de controle EQ.EC 012 (vazia).

[00275] 4C] Melhoria da produção por inativação da glicólise e da via oxidativa das pentose-fosfato e superexpressão da piruvato descarboxilase e glutamato desidrogenase.

a) *Remoção do cassete de seleção por recombinação específica de regiões FTR por Flp recombinase*

[00276] Esta etapa é realizada da mesma forma que no exemplo 4A] acima.

[00277] A cepa obtida é chamada **EQ.EC002: MG1655 ΔsucA**

b) *Deleção do gene zwf*

[00278] A deleção do gene zwf (GeneID: 946370) é realizada por recombinação homóloga e pelo uso do Kit de Recombinação Quick & Easy *E. coli* Gene Deletion Red®/ET® (Gene Bridges) de acordo com o protocolo do fornecedor, conforme detalhado no Exemplo 4A]. A cepa obtida é chamada **EQ.EC010: MG1655 ΔsucA Δzwf**

c) Deleção do gene *gapA*

[00279] A deleção do gene *gapA* na cepa EQ.EC010 de *Escherichia coli* K-12 é realizada por recombinação homóloga e o uso do Kit de Recombinação Quick & Easy *E. coli* Gene Deletion Red®/ET® (Gene Bridges) de acordo com o protocolo do fornecedor, como detalhado no Exemplo 4A]. Deleções são verificadas por genotipagem e sequenciamento e o nome das cepas obtidas é:

- EQ.EC002: MG1655 Δ sucA
- EQ.EC010: MG1655 Δ sucA Δ zwf
- EQ.EC011: MG1655 Δ sucA Δ zwf Δ gapA

d) Inserção da engenharia necessária para fixação de CO₂

[00280] Para a expressão recombinante dos diferentes componentes do sistema PRK funcional/RuBisCO em *E. coli*, os genes descritos na Tabela 22 e que codificam um RuBisCO do tipo II, uma fosforibuloquinase e uma anidrase carbônica são克lonados como um operon sintético contendo os genes descritos acima (Tabela 23)

Tabela 22: Genes que codificam um RuBisCO do tipo II, uma fosforibuloquinase, uma anidrase carbônica, uma glutamato desidrogenase e uma piruvato carboxilase

Genes	GenBank	Organismo
<i>cbbM</i>	YP_427487.1	<i>Rhodospirillum rubrum</i>

<i>Prk</i>	BAD78757.1	<i>Synechococcus elongatus</i>
<i>CA</i>	YP_427143.1	<i>Rhodospirillum rubrum</i>
<i>gdhA</i>	NP_416275.1	<i>Escherichia coli</i> K-12
<i>pycA</i>	NP_389369.1	<i>Bacillus subtilis</i>

Tabela 23: Nomes de plasmídeos e composição do cassete de expressão

Plasmídeo	Estrutura do operon sintético no vetor pZA11								
	Gene A	RBS1	Gene B	RBS2	Gene C	RBS3	Gene D	RBS4	Gene E
pZA11									
pEQEC009	<i>cbbM</i>	B	<i>gdhA</i>	C	<i>pycA</i>	E	<i>prk</i>		
pEQEC010	<i>cbbM</i>	B	<i>gdhA</i>	C	<i>pycA</i>	E	<i>prk</i>	D	<i>CA</i>
pEQEC011		B	<i>gdhA</i>	C	<i>pycA</i>				

[00281] Para controlar o nível de expressão destes genes, sequências de ligação ao ribossoma (RBS) apresentadas na Tabela 17 (ver Exemplo 4A]), com eficiências de tradução variáveis, são inseridas entre a fase de codificação de cada gene. A sucessão de cada fase de codificação intercalada por uma sequência de RBS é construída por inserções sucessivas em um vetor pZA11 (Expressys) que contém um promotor PLtetO-1, uma origem de replicação p15A e um gene de resistência à ampicilina. A adição de uma glutamato desidrogenase (*gdhA*) e uma piruvato carboxilase (*pycA*) permite uma melhor produção de ácido glutâmico. A adição de uma anidrase carbônica (*CA*) também permite a interconversão de íons bicarbonato nas

moléculas de CO₂ disponíveis e melhora a eficiência do RuBisCO.

[00282] Várias cepas são produzidas por eletroporação dos diferentes vetores apresentados de acordo com o plano abaixo:

EQ.EC 016 → (EQ.EC 002+ pEQEC011): MG1655 Δ sucA
(glutamato desidrogenase + piruvato carboxilase)

EQ.EC 017 → (EQ.EC 011+ pEQEC009): MG1655 Δ sucA Δ zwf
 Δ gapA (RuBisCO + PRK + glutamato desidrogenase + piruvato carboxilase)

EQ.EC 018 → (EQ.EC 011+ pEQEC010): MG1655 Δ sucA Δ zwf
 Δ gapA (RuBisCO + PRK + anidrase carbônica + glutamato desidrogenase + piruvato carboxilase + anidrase carbônica)

[00283] Após a transformação, os clones são selecionados em glicerol LB, meio de piruvato suplementado com 100 mg/L de ampicilina. Uma fase de adaptação e evolução das cepas com engenharia de PRK e RuBisCO é realizada conforme descrito no Exemplo 4A].

e) Produção de glutamato

[00284] Para a produção de glutamato, células de 500 mL de cultura LB são inoculadas em 20 mL de meio MS (40 g/L de glicose, 1 g/L de MgSO₄.7H₂O, 20 g/L de (NH₄)₂SO₄, 1 g/L de KH₂PO₄, 10 mg/L de FeSO₄.7H₂O, 10 mg/L de MnSO₄.7H₂O, 2 g/L de extrato de levedura, 30 g/L de CaCO₃, 100 mg/L ampicilina a uma pressão de 0,1 atmosfera de CO₂.

[00285] O glutamato residual e a glicose são medidos com um bioanalisador (YSI Inc.). O rendimento de carbono $Y_{p/s}$ é calculado em gramas de glutamato produzido por grama de glicose consumida.

[00286] Este rendimento aumenta significativamente em 15% para as cepas EQ.EC 017 e EQ.EC 018 em comparação com a cepa de controle EQ.EC 016.

Exemplo 5: Melhoria da produção de poli-hidroxibutirato em *C. necator*

[00287] O aumento no poder redutor obtido através das modificações genéticas propostas de acordo com a invenção pode também ter um ganho considerável em relação às vias metabólicas existentes.

[00288] Este é o caso da cepa bacteriana *Cupriavidus necator* ATCC 17699 que produz naturalmente polihidroxibutirato (PHB). Esta bactéria é capaz de se desenvolver sob condições autotróficas e heterotróficas. A deleção do gene *gapA* (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase NC_008313.1) desvia o fluxo metabólico para a via das pentose-fosfato e aumenta o pool de nucleotídeos reduzidos por NADPH, aumentando assim o rendimento de produção de PHB.

[00289] Esta cepa *C. necator* H16 possui um megaplasmídeo pHG1 e dois cromossomos. A deleção do gene *gapA* é realizada gerando um vetor contendo o gene *sacB* do suicídio de *Bacillus subtilis* para bactérias Gram-negativas

(Quandt et al., Gene. 1993 15 de maio; 127 (1): 15-21; Lindenkamp et al., Appl Environ Microbiol, 2010 Ago; 76 (16): 5373-82 e Appl Environ Microbiol, 2012 Ago; 78 (15): 5375-83).

a) Inativação da via metabólica de Entner-Doudoroff

[00290] Dois amplicons de PCR correspondentes às regiões adjacentes dos genes edd e eda (a montante de edd e a jusante de eda) são clonados por restrição de acordo com o procedimento descrito em Srinivasan et al. (Appl Environ Microbiol. 2002 Dec; 68 (12): 5925-32), no plasmídeo *pJQ200mp18Cm*.

[00291] O plasmídeo modificado *pJQ200mp18Cm* :: Δ edd-eda é então transformado em uma cepa de *E. coli* S17-1 pelo método de transformação do cloreto de cálcio. A transferência de material genético para *C. necator* é feita por conjugação, depositando-se em ágar uma mancha de cultura *C. necator* em uma placa contendo uma monocamada de células da bactéria S17-1. A seleção feita em um meio de caldo de nutriente (NT) a 30 °C na presença de 10% de sacarose para efeitos de seleção (Hogrefe et al., J Bacteriol. Abril de 1984; 158 (1): 43-8) e validado em um meio mineral contendo 50 µg/mL de cloranfenicol.

[00292] As deleções são validadas por genotipagem e sequenciamento. A cepa resultante EQCN_002, portanto, possui

deleções dos genes da via metabólica de Entner-Doudoroff edd-eda. **EQCN_002: H16 Δedd-eda.**

b) Inativação da via da glicólise

[00293] Dois amplicons de PCR correspondentes às regiões adjacentes do gene gapA são clonados por restrição de acordo com o procedimento descrito em Lindenkamp et al. 2012, no plasmídeo pjQ200mp18Tc.

[00294] O plasmídeo modificado pjQ200mp18Tc:: ΔgapA é então transformado em uma cepa de *E. coli* S17-1 pelo método de transformação do cloreto de cálcio. A transferência de material genético é feita por conjugação, depositando em ágar uma mancha de cultura *C. necator* em uma placa contendo uma monocamada de células da bactéria S17-1. A seleção é feita em meio nutriente de caldo (NT) a 30 °C na presença de 10% de sacarose para fins de seleção (Hogrefe et al., J Bacteriol. Abril de 1984; 158 (1): 43-8) e validado em meio mineral contendo 25 µg/mL de tetraciclina.

[00295] As deleções são validadas por genotipagem e sequenciamento. A cepa obtida, EQCN_003, portanto, possui uma deleção do gene gapA. **EQCN_003: H16 Δedd-eda ΔgapA.**

[00296] A cepa EQCN_003, com uma deleção na via glicolítica no gene gapA e na via de Entner-Doudoroff nos genes edd-eda, é cultivada para melhorar o rendimento da produção de PHB fixando CO₂ exógeno através do uso das enzimas PRK e RuBisCO.

b) Produção de PHB em um biorreator,

[00297] O inóculo de um caldo congelado é espalhado em meio sólido a uma taxa de 50 a 100 μ L de um criotubo incubado a 30 °C por 48 a 96 h na presença de frutose. A expressão de genes que codificam RuBisCO e PRK são mantidas em *C. necator* em condições aeróbicas heterotróficas (Rie Shimizu et al, Sci Rep 2015; 5: 11617. Publicado online 2015 jul 1.).

[00298] Culturas em lote em frascos Erlenmeyer (10 mL em 50 mL, depois 50 mL em 250 mL) são realizadas com o meio de cultura apropriado, em 20 g/L de frutose e 10% de CO₂ exógeno em uma incubadora de agitação (100-200 rpm 30 °C), com uma inoculação mínima de 0,01.

[00299] A cepa de interesse EQCN_003 melhorando o rendimento da produção de PHB é comparada com uma cepa de referência H16 naturalmente acumulando PHB sob condições heterotróficas na presença de uma limitação nutricional.

[00300] A produtividade das cepas é comparada em biorreatores. Culturas realizadas em biorreatores são semeadas a partir de cadeias de amplificação sólidas e/ou líquidas em frascos de Erlenmeyer nas condições descritas acima. Os biorreatores, do tipo My-control (Applikon Biotechnology, Delft, Holanda) 750 mL ou Biostat B (Sartorius Stedim, Gtingen, Alemanha) 2,5 L, são semeados a uma densidade equivalente a 0,01 OD_{620nm}.

[00301] O acúmulo de PHB é desacoplado do crescimento. A cultura é regulada a 30 °C, a aeração está entre 0,1 VVM (volume de gás/volume de líquido/min) e 1 VVM para manter uma concentração mínima de oxigênio dissolvido acima de 20% (30 °C, 1 bar), agitação é adaptada de acordo com a escala do biorreator usado. O fluxo de gás de entrada consiste em ar opcionalmente suplementado com CO₂. A suplementação de CO₂ está entre 1% e 10%. O pH é ajustado para 7 com uma solução de amônia a 14% ou 7%. O método de cultura em lote alimentada permite um suprimento de substrato de carbono não limitante combinado com uma limitação de fósforo ou nitrogênio, enquanto mantém uma relação carbono/fósforo ou carbono/nitrogênio constante. Extração e quantificação de PHB são realizadas de acordo com o método de Brandl et al. (Appl Environ Microbiol. 2013 Jul; 79 (14): 4433-9). O protocolo consiste na adição de 1 mL de clorofórmio a 10 mg de células liofilizadas, seguido de 850 µL de metanol e 150 µL de ácido sulfúrico. A mistura é aquecida por 2,5 h a 100 °C, resfriada e 500 µL de água são adicionados. As duas fases são separadas por centrifugação e a fase orgânica é seca por adição de sulfato de sódio. As amostras são filtradas e analisadas como descrito por Müller et al. (Appl Environ Microbiol. 2013 Jul; 79 (14): 4433-9).

[00302] Uma comparação entre culturas de *C. necator* H16 do **tipo selvagem** e a cepa **EQCN_003: H16 Δedd-edd ΔgapA**

mostra um aumento de 5% no rendimento de carbono, correspondendo aqui à razão gramas de PHB por grama de frutose consumida.

Exemplo 6: Melhoria da produção de GABA em *E. coli*

[00303] Uma cepa *Escherichia coli* K-12, geneticamente modificada para aumentar o rendimento da sua produção de glutamato de acordo com o exemplo 4B], pode também ser modificada para permitir a expressão constitutiva de um glutamato descarboxilase *gadB* (Gene ID: 946058) e assim aumentar o rendimento de produção de ácido γ -aminobutírico.

[00304] A deleção do gene da alfa-cetoglutarato desidrogenase também aumenta a produção de glutamato (Usuda et al. J Biotechnol. 2010, 3 de maio; 147 (1): 17-30. Doi: 10.1016/j.jbiotec.2010.02.018).

[00305] Neste exemplo, as seguintes cepas são usadas, obtidas do exemplo 4B]:

- EQ.EC002: MG1655 Δ sucA
- EQ.EC010: MG1655 Δ sucA Δ zwf
- EQ.EC011: MG1655 Δ sucA Δ zwf Δ gapA

a) Superexpressão constitutiva do gene *gadB*

[00306] A superexpressão do gene *gadB* é subclonada em um vetor de expressão bacteriana pZE21MCS (EXPRESSYS). Este vetor tem uma origem de replicação ColE1 e um gene de resistência a antibióticos de canamicina.

[00307] Rapidamente, a fase de codificação do gene

gadB (Gene ID: 946058) é amplificada a partir do genoma da cepa MG1655 ΔsucA com iniciadores homólogos ao genoma de *Escherichia coli* K-12 cobrindo as posições 1570595 a 1570645 e 1572095 a 1572045. Cada um desses iniciadores é acoplado a sequências homólogas flutuantes ao longo de 18 nucleotídeos nas extremidades do fragmento obtido por amplificação do vetor pZE21MCS excluindo o local de clonagem múltipla. Os dois amplicons são combinados de acordo com o protocolo do In-Fusion® HD Cloning Kit User Manual - Clontech para formar o **plasmídeo pEQEC030** permitindo a superexpressão constitutiva do gene *gadB*.

b) Inserção da engenharia requerida para fixação de CO₂
 [00308] Para a expressão recombinante dos diferentes componentes de um RuBisCO do tipo I funcional em *E. coli*, os genes descritos na Tabela 17 (Exemplo 4A]), são clonados como um operon sintético seguindo a estrutura de construção descrita na Tabela 22.

[00309] Montagem dos diferentes vetores
 [00310] As sequências codificantes (CDS) dos genes descritos na

[00311] Tabela 24 é amplificada e montada em blocos de acordo com o protocolo fornecido com o Kit de Mistura Principal de Montagem de DNA HiFi (NEBuilder®) (E2321), de modo a obter três blocos de integração descritos na

[00312] Tabela 24. Cada bloco é então amplificado de

acordo com o protocolo do In-Fusion® HD Cloning Kit User Manual - Clontech para formar os plasmídeos descritos abaixo na

[00313] Tabela 24

[00314] **Tabela 24: Composição de cassetes de expressão**

Plasmídeo	Estrutura do operon sintético no vetor pZA11						
	Bloco I			Bloco II		Bloco III	
	CDS A	RBS1	CDS B	RBS2	CDS C	RBS3	CDS D
pZA11							
pEQEC006	<i>rbcS</i>	D	<i>rbcL</i>	B	<i>rbcX</i>	F	<i>prk</i>

[00315] Para controlar o nível de expressão destes genes, as sequências de ligação ao ribossoma (RBS) apresentadas na Tabela 19 (Exemplo 4B]), com eficiências de tradução variáveis (Levin-Karp et al., ACS Synth Biol. 2013 Jun 21; 2 (6): 327-36.doi: 10.1021/sb400002n; Zelcbuch et al., Nucleic Acids Res. 2013 May; 41 (9): e98) são inseridos entre a fase de codificação para cada gene. A sucessão de cada fase de codificação intercalada por uma sequência de RBS é construída por inserções sucessivas em um vetor pZA11 (Expressys) que contém um promotor PLtetO-1, uma origem de replicação p15A e um gene de resistência à ampicilina. A adição de uma glutamato-descarboxilase (gadB) também permite a conversão do glutamato em gama-aminobutirato (GABA).

[00316] Várias cepas são produzidas por eletroporação dos diferentes vetores apresentados de acordo com o plano abaixo

EQ. EC 013 → (EQ. EC 002+ pZA11+pEQ030) : MG1655 ΔsucA + (gadB)

EQ. EC 020 → (EQ. EC 011+pEQ030+pEQEC006) : MG1655 ΔsucA Δzwf ΔgapA + (gadB) + (RuBisCO+PRK)

[00317] Após a transformação, os clones são selecionados em glicerol LB, meio de piruvato suplementado com 100 mg/L de ampicilina e 30 mg/L de canamicina. Uma fase de adaptação e evolução das cepas com engenharia de PRK e RuBisCO é realizada conforme descrito no Exemplo 4A].

c) produção de GABA

[00318] Para a produção de GABA, células de 500 mL de cultura LB são inoculadas em 20 mL de meio MS (40 g/L de glicose, 1 g/L de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 20 g/L de $(NH_4)_2SO_4$, 1 g/L de KH_2PO_4 , 10 mg/l de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 10 mg/L de $MnSO_4 \cdot 7H_2O$, 2 g/L de extrato de levedura, 30 g/l de $CaCO_3$, 100 mg/L de ampicilina e 30 mg/L de canamicina a uma pressão de 0,1 atmosfera de CO_2 , 30 a pH 3,5.

[00319] A concentração de GABA é medida por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), utilizando uma coluna OptimaPak C18 (4,6 x 150 mm, RS Tech Corporation, Daejeon, Coreia). As amostras são centrifugadas a 12.000 rpm por 5 minutos, 100 μL do sobrenadante transferido para um

novo tubo Eppendorf. Os seguintes reagentes são adicionados a estes tubos: 200 μ L de tampão de bicarbonato de sódio a 1 M (pH 9,8), 100 μ L de cloreto de dansilo a 80 g/l em acetonitrila e 600 μ L de água bidestilada. A mistura é incubada a 80 °C durante 40 minutos. A reação é interrompida pela adição de 100 μ L de ácido acético a 2%. A mistura é centrifugada a 12.000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante é então filtrado através de um filtro Millipore de 0,2 μ m e analisado por HPLC em um sistema Agilent usando um detector de UV. As amostras derivadas são separadas utilizando um gradiente não linear binário usando o eluente A [tetra-hidrofurano/metanol/acetato de sódio 50 mM a pH 6,2 (5: 75: 420, em volume)] e o eluente B (metanol). A glicose residual é medida com um bioanalisador (YSI Inc.).

[00320] O rendimento de carbono $Y_{p/s}$ é calculado em gramas de GABA produzido por grama de glicose consumida.

[00321] Este rendimento aumenta significativamente em 15% para a cepa EQ.EC 020 Δ sucA Δ zwf Δ gapA (RuBisCO + PRK) + (GadB) em comparação com as cepas de controle EQ.EC 013 Δ sucA (GadB).

Exemplo 7: Melhoria da produção de succinato e oxalato em *E. coli*

[00322] Uma cepa de *Escherichia coli* K-12, geneticamente modificada para permitir a expressão constitutiva de uma glioxilato desidrogenase FPGLOXD1 (Gene

ID: 946058) de *Fomitopsis palustris*, para reduzir a expressão do gene *icd* (Gene ID: 945702), e para inativar o *aceB* (GeneID 948512) e genes *sdhA* (Gene ID: 945402), aumentariam o rendimento da produção de succinato e ácido oxálico.

[00323] A redução na expressão da isocitrato desidrogenase (*icd*) permite que o fluxo metabólico seja redirecionado para o shunt gioxílico. A inativação da malato sintase (*aceB*) e da succinato desidrogenase (*sdhA*) impede que o gioxilato e o succinato, respectivamente, sejam reutilizados. A deleção do gene da succinato desidrogenase aumenta a produção de succinato sob condições aeróbicas (Yang et al., *Microbiol res.* 2014 May-Jun; 169 (5-6): 432-40). A deleção do gene da malato sintase permite o acúmulo de gioxilato que será convertido em oxalato pela expressão constitutiva da gioxilato desidrogenase.

[00324] Neste exemplo, é utilizada uma cepa MG1655 de *Escherichia coli* K-12 na qual o gene *sdhA* foi eliminado. Esta cepa é derivada de um banco de eliminação de genes (Baba et al. *Mol Syst Biol.* 2006; 2: 2006.0008) em *Escherichia coli* K-12 e fornecido pelo Coli Genetic Stock Centre sob o nome JW0715-2 e com a referência 8302. (JW0713-1: **MG1655 ΔsdhA :: Kan**).

a) *Remoção do cassete de seleção por recombinação específica de regiões FTR por Flp recombinase*

[00325] A fim de poder reutilizar a mesma estratégia

de deleção usada para construir a cepa JW0715-2 acima (Rodriguez et al., 2016), o cassete de seleção é deletado usando uma recombinase.

[00326] O plasmídeo p707-F1pe (fornecido no Kit de Recombinação Quick & Easy *E. coli* Gene Deletion Red®/ET® por Gene Bridges) é transformado por eletroporação de acordo com o protocolo do kit. As células são selecionadas em LB ágar suplementado com 0,2% de glicose, 0,0003% de tetraciclina e adicionadas com 0,3% de L-arabinose. Uma contra-seleção dos clones obtidos é realizada pela verificação de que eles não são mais capazes de crescer no mesmo meio suplementado com 0,0015% de canamicina.

[00327] A cepa obtida é chamada **EQ.EC040: MG1655 ΔsdhA**
b) *Deleção do gene aceB*

[00328] A deleção do gene *aceB* (GeneID 948512) é realizada por recombinação homóloga e o uso do Kit de Recombinação Quick & Easy *E. coli* Gene Deletion Red®/ET® (Gene Bridges) de acordo com o protocolo do fornecedor.

[00329] Os oligonucleotídeos projetados para amplificar um cassete de expressão do gene de resistência FRT-PKG-GB2-neo-FRT e tendo uma sequência homóloga 5' com mais de 50 nucleotídeos para as regiões adjacentes do locus de supressão, isto é, nas posições 4215428 a 4215478 e 4217129 a 4217079 no cromossomo gerando assim braços de recombinação do cassete no genoma bacteriano de cada lado da

sequência de codificação do gene aceB.

[00330] A cepa EQ.EC040 de *Escherichia coli* K-12 é transformada por eletroporação com o plasmídeo pRedET de acordo com o protocolo do kit. As colônias obtidas são selecionadas em meio complexo rico em LB com 0,2% de glicose, 0,0003% de tetraciclina.

[00331] Transformação do amplicon obtido na primeira etapa na presença de RedET recombinase, induzida por 0,3% de arabinose em LB líquido por 1 h. Para esse fim, uma segunda transformação do cassette de deleção é realizada por eletroporação em células expressando RedET e as colônias são selecionadas em ágar LB suplementado com 0,2% de glicose, 0,0003% de tetraciclina e adicionadas com 0,3% de L-arabinose e 0,0015% de canamicina.

[00332] O plasmídeo p707-Flpe (fornecido no Kit de Recombinação Quick & Easy *E. coli* Gene Deletion Red®/ET® por Gene Bridges) é transformado por eletroporação de acordo com o protocolo do kit. As células são selecionadas em LB ágar suplementado com 0,2% de glicose, 0,0003% de tetraciclina e adicionadas com 0,3% de L-arabinose. Uma contra-seleção dos clones obtidos é realizada pela verificação de que eles não são mais capazes de crescer no mesmo meio suplementado com 0,0015% de canamicina.

[00333] A cepa obtida é chamada **EQ.EC041: MG1655 ΔsdhA ΔaceB**

c) Mudança no promotor do gene *icd*

i. Estratégia

[00334] A substituição do promotor nativo do gene *icd* (Gene ID: 945702) por um promotor mais fraco é realizada por recombinação homóloga e o uso do Kit de Recombinação Quick & Easy *E. coli* Gene Deletion Red®/ET® (Gene Bridges) de acordo ao protocolo do fornecedor.

*ii. Introdução do promotor fraco *P* _{oxb1}*

[00335] O promotor do gene *icd* é substituído por um cassete acoplando o promotor P_{oxb1} , caracterizado como fraco, e um cassete genético de resistência a antibiótico para permitir a seleção da inserção do cassete P_{oxb1} com um gene de resistência a antibiótico.

[00336] Oligonucleotídeos projetados para amplificar um cassete de expressão do gene de resistência FRT-PKG-gb2-neo-FRT e com uma sequência 5' homóloga acima de 50 nucleotídeos à região adjacente esquerda do locus do promotor *Picd* (alvo genômica LA) para o oligo sentido, isto é, as posições 1194911 a 1194961 no genoma, e a sequência Spacer R (Tabela 23) para o oligo reverso permitem a amplificação de um fragmento permitindo a montagem com o fragmento P_{oxb1} .

[00337] Oligonucleotídeos projetados para amplificar o promotor P_{oxb1} do plasmídeo PSF-OXB1 (Sigma # OGS553) e tendo uma sequência 5' homóloga acima de 50 nucleotídeos para a região adjacente direita do locus promotor *Picd* (alvo

genômico RA) para o oligo reverso, isto é, em posições 1195173 a 1195123 no genoma, e a sequência Spacer S (Tabela 25) para o oligo produzem amplificação do fragmento P_{oxb1} .

[00338] A amplificação de um fragmento de fusão utilizando o Kit NEBuilder® HiFi DNA Master Mix Montagem (E2321) permite que o promotor de substituição para ser combinado com um cassete de seleção de antibiótico.

Tabela 25: Sequências de iniciadores para amplificação do promotor do gene OXB1

Nome	Sequências de homologia com o vetor PSF-OXB1
POXB1-S (SEQ ID NO: 15)	TCGTTGCGTTACACACAC
POXB1-R (SEQ ID NO: 16)	TGTGTCGAGTGGATGGTAG
Spacer S (SEQ ID NO: 17)	GCATGAATTCTG
Spacer R (SEQ ID NO: 18)	CGAATTCTATGC

[00339] A cepa EK.EC041 de *Escherichia coli* K-12 é transformada por eletroporação com o plasmídeo pRedET de acordo com o protocolo do kit. As colônias obtidas são selecionadas em meio complexo rico em LB com 0,2% de glicose, 0,0003% de tetraciclina.

[00340] Transformação do amplicon obtido na primeira etapa na presença de RedET recombinase, induzida por 0,3% de arabinose em LB líquido por 1 hora. Para esse fim, uma segunda transformação do cassete de deleção é realizada por

eletroporação em células expressando RedET e as colônias são selecionadas em ágar LB suplementado com 0,2% de glicose, 0,0003% de tetraciclina e adicionadas com 0,3% de L-arabinose e 0,0015% de canamicina.

[00341] O plasmídeo p707-Flpe (fornecido no Kit de Recombinação Quick & Easy *E. coli* Gene Deletion Red®/ ET® por Gene Bridges) é transformado por eletroporação de acordo com o protocolo do kit. As células são selecionadas em LB ágar suplementado com 0,2% de glicose, 0,0003% de tetraciclina e adicionadas com 0,3% de L-arabinose. Uma contra-seleção dos clones obtidos é realizada pela verificação de que eles não são mais capazes de crescer no mesmo meio suplementado com 0,0015% de canamicina.

[00342] A cepa obtida é chamada **EQ.EC042: MG1655 ΔsdhA ΔaceB P_{icd} :: P_{oxb1}**

d) Deleção do gene zwf

[00343] A deleção do gene *zwf* (GeneID: 946370) é realizada por recombinação homóloga e pelo uso do Kit de Recombinação Quick & Easy *E. coli* Gene Deletion Red®/ET® (Gene Bridges) de acordo com o protocolo do fornecedor.

[00344] Oligonucleotídeos projetados para amplificar um cassete de expressão do gene de resistência FRT-PKG-gb2-neo-FRT e com uma sequência 5' homóloga acima de 50 nucleotídeos às regiões adjacentes do local de deleção, ou seja, nas posições 1934789 a 1934839 e 1936364 a 1936314 no

cromossomo gerando assim braços de recombinação do cassete no genoma bacteriano de cada lado de todo o operon.

[00345] A cepa EK.EC042 de *Escherichia coli* K-12 é transformada por eletroporação com o plasmídeo pRedET de acordo com o protocolo do kit. As colônias obtidas são selecionadas em meio complexo rico em LB com 0,2% de glicose, 0,0003% de tetraciclina.

[00346] Transformação do amplicon obtido na primeira etapa na presença de RedET recombinase, induzida por 0,3% de arabinose em LB líquido por 1 h. Para esse fim, uma segunda transformação do cassete de deleção é realizada por eletroporação em células expressando RedET e as colônias são selecionadas em ágar LB suplementado com 0,2% de glicose, 0,0003% de tetraciclina e adicionadas com 0,3% de L-arabinose e 0,0015% de canamicina.

[00347] O plasmídeo p707-Flpe (fornecido no Kit de Recombinação Quick & Easy *E. coli* Gene Deletion Red®/ET® por Gene Bridges) é transformado por eletroporação de acordo com o protocolo do kit. As células são selecionadas em LB ágar suplementado com 0,2% de glicose, 0,0003% de tetraciclina e adicionadas com 0,3% de L-arabinose. Uma contra-seleção dos clones obtidos é realizada pela verificação de que eles não são mais capazes de crescer no mesmo meio suplementado com 0,0015% de canamicina.

[00348] A cepa obtida é chamada **EQ.EC043: MG1655 ΔsdhA**

ΔaceB P_{ice} :: P_{oxb1} Δzwfe) *Dелеção do gene gapA*

[00349] A deleção do gene *gapA* é realizada por recombinação homóloga e o uso do Kit de Recombinação Quick & Easy *E. coli* Gene Deletion Red®/ET® (Gene Bridges) de acordo com o protocolo do fornecedor.

[00350] Oligonucleotídeos projetados para amplificar um cassete de expressão gênica de resistência FRT-PKG-gb2-neo-FRT e com uma sequência 5' homóloga acima de 50 nucleotídeos para as regiões adjacentes do locus de deleção, ou seja, a fase de codificação do gene (*gapA*) (GenBank: X02662.1) gerando assim braços de recombinação do cassete no genoma bacteriano.

[00351] A cepa EK.EC043 de *Escherichia coli* K-12 é transformada por eletroporação com o plasmídeo pRedET de acordo com o protocolo do kit. As colônias obtidas são selecionadas em meio complexo rico em LB com 0,2% de glicose, 0,0003% de tetraciclina.

[00352] A transformação do amplicon obtido na primeira etapa na presença da RedET recombinase induzida por arabinose a 0,3% em LB líquido durante 1 h. Para esse fim, é realizada uma segunda eletroporação das células que expressam RedET pelo cassete de deleção e as colônias são selecionadas em LB ágar suplementado com 0,2% de glicerol e 0,3% de piruvato, 0,0003% de tetraciclina e adicionado com

0,3% de L-arabinose e 0,0015% canamicina.

[00353] O plasmídeo p707-Flpe (fornecido no Kit Quick & Easy *E. coli* Gene Deletion Red®/Recombinação ET® por Gene Bridges) é transformado por eletroporação de acordo com o protocolo do kit. As células são selecionadas em LB ágar suplementado com 0,2% de glicose, 0,0003% de tetraciclina e adicionadas com 0,3% de L-arabinose. Uma contra-seleção dos clones obtidos é realizada pela verificação de que eles não são mais capazes de crescer no mesmo meio suplementado com 0,0015% de canamicina.

[00354] A cepa obtida é chamada **EQ.EC044: MG1655 ΔsdhA ΔaceB P_{icd} :: P_{oxb1} Δzwf ΔgapA**

f) Superexpressão constitutiva dos genes *FPGLOXDH1* e *aceA*

[00355] As sequências codificadoras (CDS) dos genes *FPGLOXDH1* (ID Gene: 946058) e *aceA* (ID Gene: 948517) subclonados em um vetor de expressão bacterianos pZE21MCS (EXPRESSYS) como operons sintéticos de acordo com a estrutura descrita na Tabela 24. Este vetor tem uma origem de replicação ColE1 e um gene de resistência a antibiótico de canamicina.

[00356] Cada um destes iniciadores está acoplado a sequências homólogas flutuantes ao longo de 18 nucleotídeos nas extremidades do fragmento obtido por amplificação do vetor pZE21MCS excluindo o local de clonagem múltipla. Os

dois amplicons são combinados de acordo com o protocolo do In-Fusion® HD Cloning Kit User Manual - Clontech para formar o plasmídeo pEQEC035 permitindo a superexpressão constitutiva dos genes FPGLOXDH1 e aceA.

g) *Inserção da engenharia requerida para fixação de CO₂*
 [00357] Para a expressão recombinante dos diferentes componentes de um RuBisCO do tipo I funcional em *E. coli*, os genes descritos na Tabela 17 (Exemplo 4A]), são clonados na forma de um operon sintético.

[00358] As sequências codificadoras (CDS) dos genes descritos na Tabela 2 são amplificadas e montadas em blocos de acordo com o protocolo fornecido com o Kit de Mistura Principal NEBuilder® HiFi DNA Assembly (E2321) para obter três blocos de integração descritos na Tabela 26. Cada bloco é então amplificado de acordo com o protocolo do In-Fusion® HD Cloning Kit User Manual - Clontech para formar os plasmídeos descritos abaixo na Tabela 24.

Tabela 26: Composição de cassetes de expressão

Plasmídeo	Tipo de vetor	Estrutura do operon sintético					
		Bloco I			Bloco II		Bloco III
		CDS A	RBS1	CDS B	RBS2	CDS C	RBS3
pZA11	pZA11						
pEQEC006	pZA11	rbcS	D	rbcL	B	rbcX	F

pZE21MCS	pZE21MCS						
pEQEC035	pZE21MCS	FPGLOXDH1	D	aceA			

[00359] Para controlar o nível de expressão destes genes, as sequências de ligação ao ribossoma (RBS) apresentadas na Tabela 19 (Exemplo 4B]), com eficiências de tradução variáveis (Levin-Karp et al., ACS Synth Biol. 2013 Jun 21; 2 (6): 327-36.doi: 10.1021/sb400002n; Zelcbuch et al., Nucleic Acids Res. 2013 May; 41 (9): e98) são inseridos entre a fase de codificação para cada gene. A sucessão de cada fase de codificação intercalada por uma sequência de RBS é construída por inserções sucessivas em um vetor pZA11 (Expressys) que contém um promotor PLtetO-1, uma origem de replicação p15A e um gene de resistência à ampicilina.

[00360] Várias cepas são produzidas por eletroporação dos diferentes vetores apresentados de acordo com o plano abaixo

EQ.EC045 ➔ (EQ.EC042+ pZA11+ pZE21MCS): MG1655 ΔsdhA ΔaceB P_{icd}: :P_{oxb1}

EQ.EC046 ➔ (EQ.EC045 + pEQEC006+ pEQEC035): MG1655 ΔsdhA ΔaceB P_{icd}: :P_{oxb1} Δzwf ΔgapA + (FPGLOXDH1+aceA) + (RuBisCO+PRK)

[00361] Após a transformação, os clones são selecionados em glicerol LB, meio de piruvato suplementado com 100 mg/L de ampicilina e 30 mg/L de canamicina. Uma fase

de adaptação e evolução das cepas com engenharia de PRK e RuBisCO é realizada conforme descrito no Exemplo 4A].

h) Produção de succinato e oxalato

[00362] Para a produção de succinato e oxalato, células de 500 mL de cultura LB são inoculadas em 20 mL de meio MS (40 g/L de glicose, 1 g/L de MgSO₄.7H₂O, 20 g/L de (NH₄)₂SO₄, 1 g/L de KH₂PO₄, 10 mg/l de FeSO₄.7H₂O, 10 mg/l de MnSO₄.7H₂O, 2 g/l de extrato de levedura, 30 g/l de CaCO₃, 100 mg/l de ampicilina e 30 mg/l de canamicina a uma pressão de 0,1 atmosfera de CO₂, a 30 °C a pH 3,5.

[00363] A concentração de succinato é medida por cromatografia líquida de alta performance (HPLC), as amostras de cultura são centrifugadas a 12.000 g por 5 min.

i. Determinação de succinato

[00364] O sobrenadante da cultura é filtrado através de um filtro Millipore de 0,2 µm e analisado em um sistema de HPLC Agilent (série 1100) equipado com uma coluna de troca catiônica. (Aminex HPX87-H, Bio-Rad, Hércules, CA, EUA), um detector de absorbância de UV (Agilent Technologies, G1315D) e um detector de índice de refração (RI) (Agilent Technologies, HP1047A). As amostras são separadas em uma fase móvel de 5 mM de H₂SO₄ a uma vazão de 0,4 mL/min. A temperatura do forno da coluna é de 65 °C.

[00365] A glicose residual é medida com um bioanalisador (Ysi Inc.) ou por refratometria por HPLC com

uma coluna Aminex HPX87-H.

[00366] O rendimento de carbono Yp/s é calculado em gramas de succinato produzido por grama de glicose consumida.

[00367] Este rendimento aumenta significativamente em 6% para a cepa de engenharia EQ. EC046 em comparação com a cepa de controle EQ. EC045 (vazia).

ii) determinação de oxalato

[00368] Os sedimentos são lavados duas vezes com tampão de fosfato de potássio 10 mM (pH 7,5) contendo EDTA 2 mM e armazenados a -20 °C. Amostras (1 mL) são transferidas para um tubo pré-resfriado com 0,75 g de esferas de vidro (425-600 µm) e introduzidas em um homogeneizador Fast Prep (Thermo Scientific, Erembodegem, Holanda) e submetidas a 4 rajadas de 20 s a velocidade controle 6. Os lisados são centrifugados por 20 min a 4 °C e 36.000 g. As determinações totais de proteínas são realizadas de acordo com o método de Lowry (Lowry et al., 1951). A atividade da acetil oxalacetato hidrolase (EC 3.7.1.1.1) é medida usando uma modificação da determinação ótica direta do oxaloacetato (OAA) a 255 nm como descrito em (Lenz et al., 1976). O desaparecimento do tautômero enólico OAA é verificado a 255 nm a 25 °C em um espectrofotômetro Hitachi Modelo 100-60 (Hitachi, Tóquio, Japão), utilizando cuvetas de quartzo. A mistura reacional de 1 mL contém 100 mM de imidazol-HCl (pH 7,5), 0,9 mM de MnCl₂.2H₂O, 1 mM de OAA, 20 µL de extrato celular (controles

com diferentes volumes de extratos celulares confirmam a relação linear entre atividade enzimática e a quantidade de células extraídas. A reação é iniciada pela adição do extrato celular.

[00369] O rendimento de carbono $Y_{p/s}$ é calculado em gramas de doxalato produzido por grama de glicose consumida.

[00370] Esta eficiência aumenta significativamente em 3% para a cepa de engenharia EQ.EC046 comparada com a cepa de controle EQ.EC045 (vazia).

Exemplo 8: Melhoria da produção de citrato em *Aspergillus niger*

a) Estratégia

[00371] A inativação do gene *pgkA* (Locus tag An08g02260), levando à não funcionalidade da via da glicólise, e a do gene *gsdA* (Locus tag An02g12140), inibindo a parte oxidativa da via das pentose-fosfato, são usadas para integrar a seis genes para a expressão funcional das enzimas PRK e RuBisCO, nomeadamente *RbcS*, *RbcL*, *RbcX*, *GroES*, *GroEL* e PRK para fixação de CO_2 .

b) Construtos de DNA

i) Orientar as sequências de RNA para direcionar o gene a ser inativado

[00372] Em cada um destes dois genes, foi determinada uma sequência de 20 nucleotídeos pontuada por um motivo NGG (sequência alvo CRISPR sublinhada) (Tabela 27). Em ambos os

casos, esta sequência é específica para o gene alvo, mas também é única no genoma de *Aspergillus niger*. Estas sequências são utilizadas para expressar um RNA guia (gRNA) que, formando um heteroduplex com a região homóloga do genoma de *Aspergillus niger*, direciona a ação da endonuclease CAS9 para induzir uma quebra de cadeia dupla especificamente no locus escolhido.

Tabela 27: sequência alvo de gRNA

Locus	Gene	Genoma de referência	Tag Locus	Sequências CRISPR
1	pgkA	<i>A. niger</i> CBS 513-88	An08g02260)	CAACAAGGCCACTGGTGGCCAGG (SEQ ID NO: 19)
2	gsdA	<i>A. niger</i> CBS 513-88	An02g12140)	CATTTCCGGTCAATATGACAAGG (SEQ ID NO: 20)

[00373] O plasmídeo pFC332 (Addgene # 87845) descrito em Sarkari et al. (Bioresour Technol 2017 Dec; 245 (Pt B): 1327-1333) contém um cassete de expressão gRNA, um cassete permitindo a expressão funcional da endonuclease de cas9 e um cassete de Hph permitindo a seleção deste plasmídeo. O plasmídeo também contém o fragmento AMA1_2.8 que permite a propagação transitória do plasmídeo. Finalmente, uma origem de replicação para *E. coli* também está presente.

[00374] De modo a visar outro gene, o cassete de gRNA entre FS A e FS B pode ser facilmente trocada. Este plasmídeo é modificado pela amplificação das diferentes partes deste

plasmídeo, a fim de eliminar o cassete de seleção de antibióticos e modificar os 20 nucleotídeos permitindo que a especificidade do gRNA a favor das sequências descritas na Tabela 27 para formar plasmídeos pEQ0610 para alvo pgkA e pEQ0611 para alvo gsdA.

[00375] *Plasmídeo doador*

Regiões de homologias com o genoma

[00376] O plasmídeo doador consiste em um conjunto de kits de clonagem In-Fusion® HD Clonagem - Clontech entre o plasmídeo pUC19 (GenBank: M77789.2) e as sequências de direcionamento genômico (LA e RA) de aproximadamente 1500 pb cada, homólogas ao local escolhido para integração. As sequências de LA e RA são adjacentes a 5' e 3' respectivamente à sequência do locus visada pelo RNA guia. O heterodímero de DNA genômico/RNA guia é reconhecido pela endonuclease Cas9 para clivagem em cadeia dupla (locus 1: pgkA; locus 2: gsdA) (Tabela 28). Os fragmentos RA e LA são amplificados com iniciadores para o gene pgkA e o gene gsdA (Tabela 29). As sequências de amplificação são dadas na listagem de sequências (SEQ ID NO: 55 a SEQ ID NO: 58). Uma extensão de 18 nucleotídeos em todos os iniciadores a frente dos três fragmentos é adicionada de acordo com o protocolo do Kit de Clonagem In-Fusion® HD Cloning User Manual - Clontech, para permitir uma montagem funcional dos plasmídeos (pEQ0600 ou pEQ0601) e a introdução de dois sítios

de restrição para endonucleases de restrição do tipo II (as enzimas de restrição I-CeuI e I-SceI), que têm grandes locais de reconhecimento assimétricos (12 a 40 pares de bases). Estas são sequências de reconhecimento de 18 pares de bases, tão raros. O fato da clivagem ser assimétrica no local de reconhecimento permite a liberação de um fragmento sem sequências do vetor bacteriano pUC19. Estas duas enzimas permitem que o bloco de integração seja extraído por restrição após amplificação por clonagem em *E. coli*.

Tabela 28: Amplificação de regiões de homologia para o gene pgkA

Amplicon	Alias	Posição do iniciador	Sequência do iniciador
5'pgkA_A. niger	LA1	A frente	GGATCGCAGATACTGGTCGC (SEQ ID NO: 21)
		Reverso	CCTCGGTGAAGACAAACGCTG (SEQ ID NO: 22)
3'pgkA_A. niger	RA1	A frente	CTCCTTGAGAACCTGCGTTCC (SEQ ID NO: 23)
		Reverso	CTGAAGTACGTTCCCAAGCC (SEQ ID NO: 24)

Tabela 29: Amplificação de regiões de homologias para o gene gsdA

Amplicon	Alias	Posição do Iniciador	Sequência do iniciador

5'gsdA_A. niger	LA2	A frente	CGTTATCACAAAGAAGCCAGGTCC (SEQ ID NO: 25)
		Reverso	GCTGCTCTCGATTCCCTGGT (SEQ ID NO: 26)
3'gsdA_A. niger	RA2	A frente	TCATCAACCTCAACAAGCACCTC (SEQ ID NO: 27)
		Reverso	GTGAAGACAGCGGCGGTCC (SEQ ID NO: 28)

[00377] ***Engenharia dos cassetes de expressão***

[00378] Os promotores e terminadores são identificados com base nos dados do GenBank. Os promotores selecionados são determinados a partir do ponto de transcrição +1 e sobem 1,4 kb a montante de modo a cobrir ambas as sequências do "núcleo" (caixa TATA) e as sequências transativadoras permitindo a funcionalidade ótima do promotor em questão.

[00379] Para os terminadores, o corte é feito 500 pb após o códon de parada do gene.

[00380] A estrutura de cada bloco de integração de quatro cassetes de expressão é definida como segue: o primeiro nível consiste em elementos simples, a saber, promotores, sequências de codificação (CDS) e terminadores. O promotor (Tabela 30) e terminador (Tabela 31), cujas sequências são fornecidas na listagem de sequências (SEQ ID NO: 59 a 62), são amplificadas e montadas com o CDS de

engenharia de acordo com a Tabela 32. As CDS, cujas sequências são fornecidas na listagem de sequências (SEQ ID NO: 63 a 66), são amplificados de acordo com o protocolo fornecido com o Kit de Mistura Principal de Montagem de DNA HiFi para NEBuilder® (E2321) para obter os cassetes de expressão funcional compiladas na tabela. Cada bloco de integração de quatro genes é organizado para incluir quatro pares diferentes (promotor/terminador), a fim de limitar a interferência. Cada bloco de integração de seis genes é organizado para incluir seis pares diferentes (promotor/terminador), a fim de limitar a interferência transcripcional.

[00381] ***Fragmento doador para inserção no locus alvo do genoma***

[00382] Os diferentes cassetes de expressão múltipla (RbcS, RbcL e RbcX) ou (GroES, GroEL e PRK) são amplificadas e montadas em torno de um cassete de seleção de antibiótico (Tabela), de acordo com o protocolo do In-Fusion® HD Cloning Kit User Manual - Clontech, para formar plasmídeos dadores (pEQ0602 ou pEQ0603).

Tabela 30: Localização nativa de promotores de *Aspergillus niger* usados em combinatória genômica para inserir os seis genes da engenharia de fixação de CO₂ no genoma de *Aspergillus niger*.

Promotores	Organismo	Gene ID	Iniciador reverso	iniciador a frente
PmbfA	<i>A. niger</i>	An02g12390	TTTGAAGATGGATGAGAAGTCGG CBS 513- 88	GCCATGAAATCCAATCATTCC (SEQ ID NO: 33) (SEQ ID NO: 29)
PcoxA	<i>A. niger</i>	An07g07390	TGTCCTGGTGGGTGGT TG CBS 513- 88	GACGGCATTGAGCAACATC (SEQ ID NO: 34) (SEQ ID NO: 30)
PsrpB	<i>A. niger</i>	An16g08910	CTCGAACGAGAATGGGAACC CBS 513- 88	TTGGCAGGGTCACGTAGCC (SEQ ID NO: 35) (SEQ ID NO: 31)
PtvdA	<i>A. niger</i>	An04g01530	GGCGGAATGAGATGCGACAG CBS 513- 88	TTAGTCCATTCAAGCAAGCTGCC (SEQ ID NO: 36) (SEQ ID NO: 32)

Tabela 31: Localização nativa dos terminadores de *Aspergillus Niger* usados em combinatória genômica para inserir os seis genes da engenharia de fixação de CO₂ no genoma de *Aspergillus niger*.

Terminadores	Organismo	Gene ID	Iniciador reverso	iniciador a frente
TtrpC	<i>A. nidulan</i>	AN0648	TGATTAAATAGCTCCATGTCAAC s FGSC A4	GGGTAAACGACTCATAGGAGAG AAG (SEQ ID NO: 37) TTG (SEQ ID NO: 41)
TniaD	<i>A. nidulan</i>	AN1006	ACGGGTTCGCATAGGTTGG s FGSC A4	GGGATATTGACACGATTCTGA (SEQ ID NO: 38) GG (SEQ ID NO: 42)
TglaA	<i>A. niger</i>	An03g0655	CGACCGCGACGGTGACTGAC 0 CBS	CCGGAGATCCTGATCATCCG (SEQ ID NO: 39) (SEQ ID NO: 43)

		513-88		
TgpdA	A. <i>niger</i>	An16g0183 0	GAATCAGGACGGCAAACCTGAAT (SEQ ID NO: 40)	CGTGGTCTAGCTGCCCTCC (SEQ ID NO: 44)
	CBS			
		513-88		

Tabela 32: Montagem de cassetes de expressão

Cassete de expressão	Gene	GenBank	Otimização de códon	Promotor	Terminador
CAS 1	RbcL	BAD78320.1	Sim	PmbfAp	trpct
CAS 2	RbcS	BAD78319.1	Sim	PcoxAp	TniaD
CAS 3	RbcX	BAD80711.1	Sim	PsrpBp	glaAt
CAS 4	Hph	pUG75 (P30671)	Não	picdAp	TgpdA
CAS 5	GroES	U00096	Não	PmbfAp	trpct
CAS 6	GroEL	AP009048	Não	PcoxAp	TniaD
CAS 7	PRK	BAD78757.1	Sim	PsrpBp	glaAt
CAS 8	Ble	pUG66 (P30116)	Não	picdAp	TgpdA

[00383] Tabela 33: Montagem de plasmídeo

plasmídeo	sequência genômica	Promotor	Gene	Terminador	sequência genômica	ori	Selection marker
pEQ0600	LA1				RA1	coli	Ampicilina
pEQ0601	LA2				RA2	coli	Ampicilina
pEQ0602	LA2	PmbfAp	RbcL	trpct	RA2	coli	Ampicilina
		PcoxAp	RbcS	TniaD		coli	e
		PsrpBp	RbcX	glaAt		coli	hidromicina
		picdAp	Hph	TgpdA		coli	B
pEQ0603	LA1	PmbfAp	GroES	Trpct	RA1	coli	Ampicilina
		PcoxAp	GroEL	TniaD		coli	e
		PsrpBp	PRK	glaAt		coli	bleomicina
		picdAp	Blue	TgpdA		coli	

c) Transformação de *Aspergillus niger*

[00384] A transformação do DNA em *Aspergillus niger* é limitada pela presença da parede celular do fungo e é extremamente ineficaz em comparação com a levedura ou a *Escherichia coli*. No entanto, a transformação de protoplastos preparados a partir de hifas ou conidiósporos fúngicos para germinação por tratamento com enzimas degradadoras da parede celular como o coquetel consistindo de Lysing Enzyme® de *Trichoderma harzianum*, quitinase de *Streptomyces griseus* e β -glucuronidase de *Helix pomatia* (de Bekker et al J, Microbiol Methods, 2009 Mar; 76 (3): 305-6) permite que os transformantes sejam produzidos.

[00385] A cepa CBS 513-88 de *A. niger* cresceu a 30 °C em um frasco Erlenmeyer de 1 L com 250 mL de meio de transformação (Kusters-van Someren et al., Curr Genet. 1991 Sep; 20 (4): 293-9). Após crescimento durante 16 h a 250 rpm, o micélio é recolhido por filtração em Miracloth (Calbiochem) e lavado com água deionizada. Os protoplastos são preparados na presença de enzimas de lise de 5 g/L de *Trichoderma harzianum* (Sigma Saint Louis, MO, EUA), 0,075 Uml-1 quitinase de *Streptomyces griseus* (Sigma) e 460 Uml-1 glucuronidase de *Helix pomatia* (Sigma) em KMC (KCl a 0,7 M, CaCl₂ a 50 mM, Mes/NaOH a 20 mM, pH 5,8) durante 2 horas a 37 °C e 120 rpm. A formação de protoplastos é monitorada a cada 30 minutos com um microscópio. Os protoplastos são filtrados através de um filtro Miracloth e recolhidos por

centrifugação a 2000 x g e 4 °C durante 10 minutos. Os protoplastos são lavados com STC frio (1,2 M de sorbitol, 10 mM de Tris/HCl, 50 mM de CaCl₂, pH 7,5) e depois ressuspensos em 100 µl de STC e utilizados diretamente para a transformação.

[00386] De modo a integrar uma via metabólica no genoma de *A. niger*, é necessária a co-transformação de um plasmídeo e um fragmento linear. O plasmídeo pEQ0610 é co-transformado com um fragmento doador para integrar parte da engenharia no genoma enquanto inativa o gene pgkA. Similarmente, o plasmídeo pEQ0611 é co-transformado com um fragmento doador para integrar a outra parte da engenharia no genoma enquanto inativa o gene gsdA. Estas sequências servem tanto como matrizes para recombinação homóloga e como marcadores de seleção: durante a integração com a expressão funcional dos genes de resistência a antibióticos Hph ou Ble. As cepas são diretamente selecionadas em placas de meio mínimo com adição de higromicina B ou bleomicina, permitindo seleção direta no evento de integração. Devido à presença da origem de replicação AMA1_2.8, o plasmídeo pCAS_pyrG2 é facilmente perdido causando apenas a expressão transiente da proteína Cas9, reduzindo assim o risco de efeitos adversos não visados.

[00387] Cassetes lineares (10 µg) e plasmídeo (5 µg) são misturados com 100 µl de solução de STC contendo pelo

menos 10^7 protoplastos e 330 μl de solução de polietilenoglicol (PEG) preparada de fresco (25% de PEG 6000, 50 mM de CaCl_2 , 10 mM de Tris/HCl, pH 7,5) e mantido em gelo durante 20 minutos. Após misturar com uma solução adicional de 2 mL de PEG e incubar à temperatura ambiente durante 10 minutos, a mistura de protoplastos é diluída com 4 mL de STC.

[00388] A seleção dos transformantes é realizada em placas MM, com 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de higromicina B adicionado ou placas MM com 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de bleomicina adicionado. Todos os transformantes são purificados isolando colônias individuais do meio de seleção pelo menos duas vezes. A inserção dos fragmentos é verificada por sequenciamento do locus alvo com os iniciadores de controle apropriados.

[00389] O DNA genômico de células fúngicas é isolado com um protocolo modificado, usando o Kit de Purificação de DNA Genômico Wizard® (Promega, Wisconsin, EUA). O micélio é cultivado durante a noite em CM (30 °C, 150 rpm) em 290 pi de solução de EDTA 50 mM e 10 pi de liticase (10 mg/mL) para remover a parede celular. Após 90 minutos de incubação a 37 °C, a suspensão é centrifugada e o sobrenadante é descartado. O sedimento de micélio é ressuspenso em 300 μL de solução de lise de núcleos e 100 μL de solução de precipitação de proteínas. As amostras são incubadas em gelo por 5 minutos e centrifugadas. O DNA é precipitado com isopropanol e lavado

com etanol a 70%. O sedimento de DNA é reidratado com uma solução de reidratação de DNA contendo RNase (100 µg/mL). A transformação bem-sucedida e integração dos cassetes de expressão foi verificada por PCR.

Tabela 34: Cepas utilizadas para o estudo de rendimento

Cepas	Genoma	Modificação genética
EQ1500	<i>A. niger</i> CBS 513-88	
EQ1501	<i>A. niger</i> CBS 513-88	<i>gsdA</i> :: PmbfA _p -RbcL-trpc; PcoxA _p -RbcS-TniaD; picdA _p -Hph-TgpdA; PsrpB _p -RbcX-glaAt
EQ1502	<i>A. niger</i>	<i>gsdA</i> :: PmbfA _p -RbcL-trpc; PcoxA _p -RbcS-TniaD; picdA _p -Hph-TgpdA; PsrpB _p -RbcX-glaAt
	CBS 513-88	<i>pgkA</i> :: PmbfA _p -GrES-trpc; PcoxA _p -GroEL-TniaD; picdA _p -Ble-TgpdA; PsrpB _p -PRK-glaAt

[00390] Os conídios (108/L) das cepas EQ1500 e EQ1502 são inoculados e cultivados a 30 °C em um agitador rotativo (180 rpm) em frascos de agitação contendo meio Vogel sem MnSO₄ com um teor total de glicose de 15% e um teor total de nitrogênio de 0,2% e 10% de CO₂. A determinação de glicose e ácidos orgânicos foi realizada como descrito acima (Blumhoff et al., 2013; Steiger et al., 2016) em uma HPLC (Shimadzu,

Kyoto; Japão) equipada com uma coluna Aminex HPX-87 H (300 x 7,8 mm, Bio-Rad, Hercules, CA). Um detector de índice de refração (RID-10 A, Shimadzu) é usado para a detecção de glicose e ácido cítrico, enquanto um detector de PDA (SPD-M20A, Shimadzu) a 300 nm é usado para detectar ácido cis-aconítico e trans-aconítico. A coluna utilizada a 60 °C a uma taxa de fluxo de 0,6 mL/min e com uma solução aquosa de H₂SO₄ a 0,004 M como fase móvel. A cultura foi realizada em três repetições biológicas.

d) Método analítico

[00391] Para a quantificação de metabólitos extracelulares, uma amostra de cultura é centrifugada a 14.000 x g por 5 min. O sobrenadante é filtrado através de um filtro com um tamanho de poro de 0,45 pm. O filtrado é mantido a -20 °C até análise. A concentração de citrato e de oxalato detectada e quantificada com luz ultravioleta a 210 nm utilizando uma coluna Amethyst C18-H (250 x 4,6 mm, Sepax Technologies, Newark, DE, EUA). A eluição é realizada a 30 °C com 0,03% de H₃PO₄ a uma taxa de fluxo de 0,8 mL/min. Açúcares redutores são detectados com o método do ácido 3,5-dinitrosalicílico. Determinação da biomassa: 5 mL da amostra são filtrados através de Miracloth (Calbiochem, San Diego, CA, EUA) para coletar hifas e lavadas com água destilada. As hifas são aquecidas a 105 °C em um "Miracloth". Para o cálculo do peso seco da célula (DCW), o peso do Miracloth é

medido de antemão e subtraído do peso total para dar o peso líquido, então o peso líquido por unidade de volume é calculado como DCW.

[00392] Após análise completa, a comparação do rendimento da produção de ácido cítrico em função do consumo de glicose é 18% maior na cepa genética EQ1502 do que na cepa selvagem EQ1500.

Exemplo 9: Melhoria da produção de itaconatos em *Aspergillus terreus*

a) *Estratégia*

[00393] A inativação do gene pgkA (Locus tag ATEG_00224), levando à não funcionalidade da via da glicólise, e a do gene gsdA (Locus tag ATEG_01623), inibindo a parte oxidativa da via das pentose-fosfato, são usadas para integrar a seis genes que permitem a expressão funcional das enzimas PRK e RuBisCO, nomeadamente rbcS, rbcL, rbcX, groES, groEL e prk, permitindo a fixação de CO₂.

b) *construtos de DNA*

i) *sequências de RNA guia para direcionar o gene a ser inativado*

[00394] Em cada um destes dois genes, foi determinada uma sequência de 20 nucleotídeos pontuada por um motivo NGG (sequência alvo CRISPR sublinhada) (Tabela 35). Em ambos os casos, esta sequência é específica do gene alvo, mas também é única no genoma do *Aspergillus terreus*. Estas sequências

são usadas para expressar um RNA guia (gRNA) que, formando um heteroduplex com a região homóloga do genoma de *Aspergillus terreus*, direciona a ação das endonucleases CAS9 para induzir uma quebra de fita dupla especificamente no locus selecionado. Para o pgkA, a sequência identificada no segundo ítron, os primeiros 20 nucleotídeos possuem um padrão único no genoma, permitindo até mesmo dois erros de emparelhamento. Para gsdA, a sequência identificada no quarto ítron, os primeiros 20 nucleotídeos têm um padrão único no genoma, permitindo até mesmo dois erros de emparelhamento.

Tabela 35: Sequência alvo do RNA guia

Locus	Gene	Genoma de referência	Locus tag	Sequências CRISPR
3	pgkA	<i>A. terreus</i> NIH262	<u>(ATEG 00224)</u>	CTGCGTCGGCAAGGAAGTT <u>GAGG</u> (SEQ ID NO: 45)
4	gsdA	<i>A. terreus</i> NIH2624	<u>(ATEG 01623)</u>	CATCAGCGGCCAATATGACAAGG (SEQ ID NO: 46)

[00395] O plasmídeo pFC332 (Addgene # 87845) descrito em Sakari et al. (Bioresour technol. 2017; 245 (Pt B): 1327-1333) contém um cassete de expressão de gRNA, um cassete para a expressão funcional da endonuclease Cas9 e um cassete Hph para a seleção deste plasmídeo. O plasmídeo também contém o fragmento AMA1_2.8 que permite a propagação transitória do plasmídeo. Finalmente, uma origem de replicação para *E. coli*

também está presente.

[00396] De modo a visar outro gene, o cassete de RNAR entre FS A e FS B pode ser facilmente trocada. Assim, este plasmídeo é modificado pela amplificação das diferentes partes deste plasmídeo, a fim de eliminar o cassete de seleção de antibióticos e modificar os 20 nucleotídeos, permitindo a especificidade do gRNA em favor das sequências descritas na

[00397] Tabela 35 para formar plasmídeos pEQ0615 para atingir pgkA e pEQ0616 para alvejar gsdA no genoma de *Aspergillus terreus*.

ii) Plasmídeo doador

Regiões de homologia com o genoma

[00398] O plasmídeo doador consiste em um conjunto de instruções In-Fusion® HD Cloning Kit Manual - Clontech entre o plasmídeo pUC19 (GenBank: M77789.2) e sequências de direcionamento genômico (LA e RA) de aproximadamente 1500 pb cada homólogo ao locus escolhido para integração. As sequências de LA e RA são adjacentes a 5' e 3' respectivamente à sequência do locus visado pelo RNA guia. O heterodímero de DNA genômico/RNA guia é reconhecido pela endonuclease Cas9 para clivagem em cadeia dupla (locus 1: pgkA; locus 2: gsdA) (Tabela 35). Os fragmentos RA e AL são amplificados com os iniciadores descritos na Tabela 36, para o gene pgkA, e na Tabela 37, para o gene gsdA. As sequências de amplificação

estão na listagem de sequências (SEQ ID NO: 67 a 70).

[00399] Uma extensão de 18 nucleotídeos em todos os iniciadores a frente dos três fragmentos é adicionada de acordo com o protocolo do In-Fusion® HD Cloning Kit User Manual - Clontech para permitir uma montagem funcional dos plasmídeos (pEQ0604 ou pEQ0605) (33) e introdução de dois sítios de restrição para endonucleases de restrição do tipo II (enzimas de restrição I-CeuI e I-SceI) que possuem grandes locais de reconhecimento assimétricos (12 a 40 pares de bases). Estas são sequências de reconhecimento de 18 pares de bases, portanto raras e não presentes na montagem descrita. O fato da clivagem ser assimétrica no sítio de reconhecimento permite que um fragmento desprovido de sequências seja liberado do vetor bacteriano pUC19. Estas duas enzimas permitem que o bloco de integração seja extraído por restrição após amplificação por clonagem em *E. coli*.

Tabela 36: Amplificação de regiões de homologia para o gene pgkA

Amplícon	Posição do iniciador	Sequência de iniciador
5'pgkA_Aterreus	A frente	CTTGGGAAATTGGGACACG (SEQ ID NO: 47)
	Reverso	TCTTGCCGATGAGCTTCTCC (SEQ ID NO: 48)
3'pgkA_Aterreus	A frente	CAGATCATCCTCCTGGAGAACCC (SEQ ID NO: 49)
	Reverso	ACGGCACGAATGTTCACCTG (SEQ ID NO: 50)

Tabela 37: Amplificação de regiões de homologias para

o gene gsdA

Amplicon	Posição do iniciador	Sequência de iniciador
5' gsdA_Aterreus	A frente	ATTGGAAGCTGGCTCTATCTCACC (SEQ ID NO: 51)
	Reverso	GCTGTTCTTCGATTTCCTTGGTG (SEQ ID NO: 52)
3' gsdA_Aterreus	A frente	TCAACCTCACCAAGCACCTCG (SEQ ID NO: 53)
	Reverso	CAAACAGCCCGTGCACACTG (SEQ ID NO: 54)

Engenharia de cassetes de expressão

[00400] Promotores e terminadores são identificados com base nos dados do GenBank. Os promotores selecionados são determinados a partir do ponto de transcrição +1 e sobem 1,4 kb a montante de modo a cobrir ambas as sequências "core" (caixa TATA) e as sequências transativadoras permitindo a funcionalidade ótima do promotor em questão.

[00401] Para os terminadores, o corte é feito 500 pb após o códon de parada do gene.

[00402] A estrutura de cada bloco de integração de quatro cassetes de expressão é definida como segue: o primeiro nível consiste em elementos simples, a saber, promotores, sequências de codificação (CDS) e terminadores. O promotor (Tabela 30) e terminador (Tabela 31) elementos são amplificados e montados com a engenharia de CDS de acordo

com a Tabela 32. Os CDS são amplificados de acordo com o protocolo fornecido com o Kit de Mistura Principal NEBuilder® HiFi DNA Assembly (E2321) para obter os cassetes de expressão funcionais compiladas na mesa. Cada bloco de integração de quatro genes é organizado para incluir quatro pares diferentes de promotores terminadores, a fim de limitar a interferência. Cada bloco de integração de seis genes é organizado para incluir seis pares diferentes de promotores terminadores, a fim de limitar a interferência transcrecional.

Fragmento doador para inserção no locus alvo do genoma

[00403] Os diferentes cassetes de expressão múltipla (RbcS, RbcL e RbcX ou GroES, GroEL e PRK são amplificadas e montadas em torno de um cassete de seleção de antibióticos (Tabela 38), de acordo com o protocolo do Cloning Kit de Clonagem HD In-Fusion® - Clontech, para formam plasmídeos dadores (pEQ0606 ou pEQ0607) .

Tabela 38: Montagem de plasmídeo

plasmídeos	sequência genómica	Promotor	Gene	Terminador	sequência genômica	ori	Marcador de seleção
pEQ0604	LA4				RA4	coli	Ampicilina
pEQ0605	LA3				RA3	coli	Ampicilina
pEQ0606	LA4	PmbfA _p	rbcL	trpct	RA4	coli	Ampicilina
		PcoxA _p	rbcS	Tn1aD		coli	e hidromicina
		PsrpB _p	rbcX	glaAt		coli	
		picdA _p	Hph	TgpdA		coli	B
pEQ0607	LA3	PmbfA _p	groES	trpct	RA3	coli	Ampicilina

		P _{coxAp}	groEL	TniaD		coli	e
		P _{srpBp}	prk	glaAt		coli	bleomicina
		P _{icdAp}	Ble	TgpdA		coli	

c) Transformação de *Aspergillus terreus*

[00404] A transformação do DNA de *Aspergillus terreus* é realizada de acordo com a estratégia aplicada para *Aspergillus niger* (Exemplo 8) utilizando a cepa NIH262 de *A. terreus*.

Tabela 39: Esforços usados para o estudo de rendimento

Cepas	Genoma	Modificação genética
EQ1600	<i>A. terreus</i> NIH262	
EQ1601	<i>A. terreus</i> NIH262	gsdA :: PmbfAp-RbcL-trpc; P _{coxAp} -RbcS-TniaD; picdAp-Hph-TgpdA; PsrpBp-RbcX-glaAt
EQ1602	<i>A. terreus</i> NIH262	gsdA :: PmbfAp-RbcL-trpc; P _{coxAp} -RbcS-TniaD; picdAp-Hph-TgpdA; PsrpBp-RbcX-glaAt pgkA :: PmbfAp-GrES-trpc; P _{coxAp} -GroEL-TniaD; picdAp-Ble-TgpdA; PsrpBp-PRK-glaAt

[00405] Cultura das cepas EQ1600 e EQ1602 de *A. terreus* em glicose a 3%.

[00406] A composição otimizada do meio descrita por

Hevekerl et al. (Appl Microbiol Biotechnol. 2014; 98: 6983-6989). Contém 0,8 g de KH_2PO_4 , 3 g de NH_4NO_3 , 1 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,67 mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 8 mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 15 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ por litro. Para mimetizar a concentração típica de açúcar obtida a partir do hidrolisado de palha de trigo (150 g/L) pré-tratado com ácido diluído (0,75% v/v, 160 °C, 10 min) e enzimaticamente sacarificado (pH 5,0, 45 °C, 72 h) uma quantidade adequada de glicose até 30 g/L é usada. Açúcares e todos os outros componentes são adicionados a partir de soluções estoque estéreis. O pH do meio sem CaCl_2 é ajustado para 3,1 com H_2SO_4 a 0,5 M antes da inoculação da preparação de esporos para as cepas EQ1600 e EQ1602. A cultura é realizada sob agitação com 25 ml de meio em frascos Erlenmeyer de 125 ml a 33 °C em um agitador rotativo a 200 rpm durante 7 a 10 dias em um ambiente de 10% de CO_2 . O pH não é verificado durante a fermentação. A agitação dos frascos é mantida durante a amostragem para estudos de tempo para garantir um fornecimento contínuo de oxigênio. Todas as experiências são realizadas em triplicado. Todos os componentes de meios são obtidos da Sigma Chemical, St. Louis, Missouri. Para estas experiências, cada açúcar foi dissolvido em água deionizada e passado através de uma coluna (440 x 45 mm) de resina de troca catiônica Dowex 50-X8 (100/200 mesh) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) para remover o manganês, se necessário.

d) Procedimentos analíticos

[00407] A concentração da massa celular é determinada a partir do peso da célula seca. A massa celular presente no caldo de fermentação é recolhida por centrifugação a 10.000 g durante 10 minutos e cuidadosamente lavada três vezes com água deionizada. A massa celular enxaguada foi completamente seca a 80 °C até se obter um peso constante. O caldo de fermentação após a centrifugação (10.000 g, 10 min) é armazenado a -20 °C antes da análise de glicose, ácido itacônico e subprodutos (ácido succínico, ácido α -cetoglutárico, ácido málico, ácido cis-aconítico e ácido trans- aconítico) utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). É utilizado um sistema de HPLC de proeminência Shimadzu (Shimadzu America, Inc., Columbia, MD). Duas colunas (coluna Aminex HPX-87P, 300 x 7,8 mm com cartucho de remoção de cinzas e cartucho de proteção Carbo-P, e uma coluna Aminex HPX 87H, 300 x 7,8 mm com cartucho Microguard Cation H (Bio-Rad)) são usadas para análise de açúcares e ácidos orgânicos, respectivamente. A coluna Aminex HPX 87P é mantida a 85 °C e a glicose é eluída com água deionizada acidificada Milli-Q (Millipore, Bedford, MA) a uma taxa de fluxo de 0,6 mL/min.

[00408] A coluna Aminex HPX 87H é mantida a 65 °C e os açúcares e os ácidos orgânicos são eluídos com H_2SO_4 a 5 mM preparada usando água deionizada Milli-Q filtrada a uma

taxa de fluxo de 0,5 mL/min. A detecção é realizada usando um detector de índice de refração para açúcares e um detector UV de 210 nm para ácidos orgânicos. O ácido propiônico (1%, peso/volume) é utilizado como padrão interno para estimar o líquido perdido durante a fermentação aeróbica durante 7 a 10 dias a 33 °C sob 10% de CO₂. Todos os padrões de HPLC, incluindo ácidos orgânicos, são adquiridos da Sigma. A concentração de manganês (nível de ppb) é determinada utilizando um espectrômetro de emissão ótica de plasma acoplado por indução (ICP-OES) Optima 7000DV (Perkin-Elmer, Waltham, MA) pelo procedimento descrito por Bakota et al. (Eur J Lipid Sci Technol. 2015; 117: 1452-1462.

[00409] Com base nos resultados da produção de ácido itacônico a partir de glicose, um incremento de rendimento em massa de ácido itacônico a partir de glicose de 15% é observado para a cepa EQ1602 em comparação com a cepa de referência EQ1600.

REIVINDICAÇÕES

1. Microrganismo geneticamente modificado **caracterizado** pelo fato de que expressa uma enzima funcional RuBisCO e uma fosforibuloquinase funcional (PRK) e no qual a via da glicólise é pelo menos parcialmente inibida, a montante da produção de 1,3-bifosfo-D-glicerato (1,3-BPG) ou a montante da produção de 3-fosfoglicerato (3PG), e a jusante da produção de gliceraldeído-3-fosfato (G3P), o referido microrganismo ser geneticamente modificado de modo a produzir uma molécula exógena de interesse e/ou a superproduzir uma molécula endógena de interesse, com exceção de uma enzima RuBisCO ou fosforibuloquinase.

2. Microrganismo geneticamente modificado, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a ramificação oxidativa da via das pentoses-fosfato, também é, pelo menos parcialmente, inibida.

3. Microrganismo geneticamente modificado, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado** pelo fato de que o referido microrganismo é geneticamente modificado para expressar uma enzima RuBisCO e/ou PRK recombinante.

4. Microrganismo geneticamente modificado, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 2 a 3, **caracterizado** pelo fato de que o referido microrganismo é geneticamente modificado para inibir a ramificação oxidativa da via das

pentoses-fosfato a montante da produção de ribulose-5-fosfato.

5. Microrganismo geneticamente modificado, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado** pelo fato de que a molécula exógena e/ou a molécula endógena é selecionada a partir de aminoácidos, peptídeos, proteínas, vitaminas, esteróis, flavonóides, terpenos, terpenóides, ácidos graxos, polióis e ácidos orgânicos.

6. Microrganismo geneticamente modificado, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 5, **caracterizado** pelo fato de que o referido microrganismo é uma célula eucariótica, preferencialmente selecionado a partir de leveduras, fungos, microalgas, ou uma célula procariótica, de preferência uma bactéria.

7. Microrganismo geneticamente modificado, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 6, **caracterizado** pelo fato de que a expressão do gene que codifica a gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase é pelo menos parcialmente inibida.

8. Microrganismo geneticamente modificado, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 7, **caracterizado** pelo fato de que a expressão do gene que codifica a fosfoglicerato-quinase é inibida, pelo menos, parcialmente.

9. Microrganismo geneticamente modificado, de acordo com a reivindicação 7 ou 8, **caracterizado** pelo fato de que

a expressão do gene que codifica a glicose-6-fosfato desidrogenase ou 6-fosfogluconolactonase ou 6-fosfogluconato desidrogenase é pelo menos parcialmente inibida.

10. Microrganismo geneticamente modificado, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 9, **caracterizado** pelo fato de que o referido microrganismo é uma levedura do gênero *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada para expressar uma RuBisCO funcional do tipo I ou II e uma fosforibuloquinase funcional (PRK), e em que a expressão do o gene TDH1, TDH2 e/ou TDH3 é pelo menos parcialmente inibida.

11. Microrganismo geneticamente modificado, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 10, o referido microrganismo **caracterizado** pelo fato de ser uma levedura *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada para expressar uma RuBisCO funcional do tipo I ou II e uma fosforibuloquinase funcional (PRK), e em que a expressão do gene PGK1 é pelo menos parcialmente inibida.

12. Microrganismo geneticamente modificado, de acordo com a reivindicação 10 ou 11, **caracterizado** pelo fato de que a expressão do gene ZWF1 é pelo menos parcialmente inibida.

13. Microrganismo geneticamente modificado, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 9, **caracterizado** pelo fato de que o referido microrganismo é um fungo filamentoso do gênero *Aspergillus* geneticamente modificado

para expressar uma RuBisCO funcional do tipo I ou II e uma fosforibuloquinase funcional (PRK), e em que a expressão dos genes pgk e gsdA é pelo menos parcialmente inibida.

14. Microrganismo geneticamente modificado, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 9, **caracterizado** pelo fato de que o referido microrganismo é uma bactéria *E. coli* geneticamente modificada para expressar uma RuBisCO funcional do tipo I ou II e uma fosforibuloquinase funcional (PRK), e em que a expressão do gene gapA e/ou pgk e, opcionalmente, o gene zwf, é pelo menos parcialmente inibida.

15. Uso de um microrganismo geneticamente modificado conforme definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 14 **caracterizado** pelo fato de ser para a produção ou superprodução de uma molécula de interesse, preferencialmente selecionada a partir de aminoácidos, peptídeos, proteínas, vitaminas, esteróis, flavonóides, terpenos, terpenóides, ácidos graxos, polióis e ácidos orgânicos.

16. Uso, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado** pelo fato de ser para a produção ou superprodução de glutamato, citrato, itaconato ou GABA.

17. Processo biotecnológico para a produção de pelo menos uma molécula de interesse, **caracterizado** pelo fato de compreender uma etapa de cultivar um microrganismo geneticamente modificado conforme descrito em qualquer uma

das reivindicações de 1 a 14, em condições que permitam a síntese ou bioconversão, pelo referido microrganismo, da referida molécula de interesse e, opcionalmente, uma etapa de recuperação e/ou purificação da referida molécula de interesse.

18. Processo biotecnológico, de acordo com a reivindicação 17, **caracterizado** pelo fato de que a molécula de interesse é selecionada de aminoácidos, peptídeos, proteínas, vitaminas, esteróis, flavonóides, terpenos, terpenóides, ácidos graxos, polióis e ácidos orgânicos.

19. Processo biotecnológico, de acordo com a reivindicação 17 ou 18, **caracterizado** pelo fato de que a molécula de interesse é selecionada de glutamato, citrato, itaconato ou GABA.

20. Processo biotecnológico, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 17 a 19, **caracterizado** pelo fato de que o microrganismo é geneticamente modificado para expressar pelo menos uma enzima envolvida na bioconversão ou síntese da referida molécula de interesse.

21. Processo biotecnológico, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 17 a 19, **caracterizado** pelo fato de que o microrganismo é geneticamente modificado para pelo menos parcialmente inibir uma enzima envolvida na degradação da referida molécula de interesse.

22. Processo para produzir uma molécula de interesse **caracterizado** pelo fato de que compreende (i) inserir pelo menos uma sequência que codifica uma enzima envolvida na síntese ou bioconversão da referida molécula de interesse em um microrganismo recombinante conforme descrito em qualquer uma das reivindicações de 1 a 14, (ii) cultivar o referido microrganismo sob condições que permitem a expressão da referida enzima e opcionalmente (iii) recuperar e/ou purificar a referida molécula de interesse.

23. Processo para produzir uma molécula de interesse **caracterizado** pelo fato de que compreende (i) inibir a expressão de, pelo menos, um gene que codifica uma enzima envolvida na degradação da referida molécula de interesse em um microrganismo recombinante conforme descrito em qualquer uma das reivindicações de 1 a 14, (ii) cultivar o referido microrganismo sob condições que permitem a expressão da referida enzima e opcionalmente (iii) recuperar e/ou purificar a referida molécula de interesse.

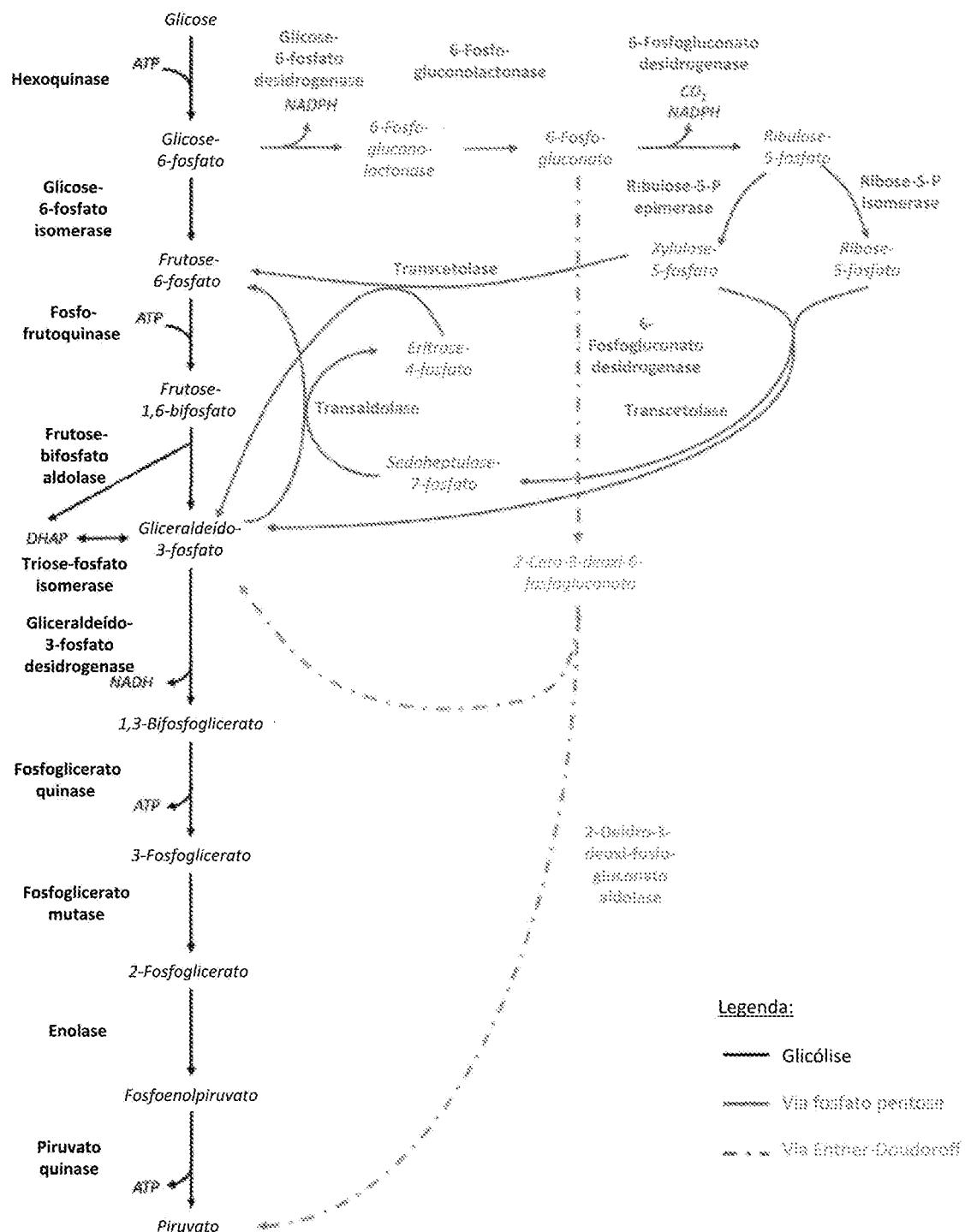


FIGURA 1

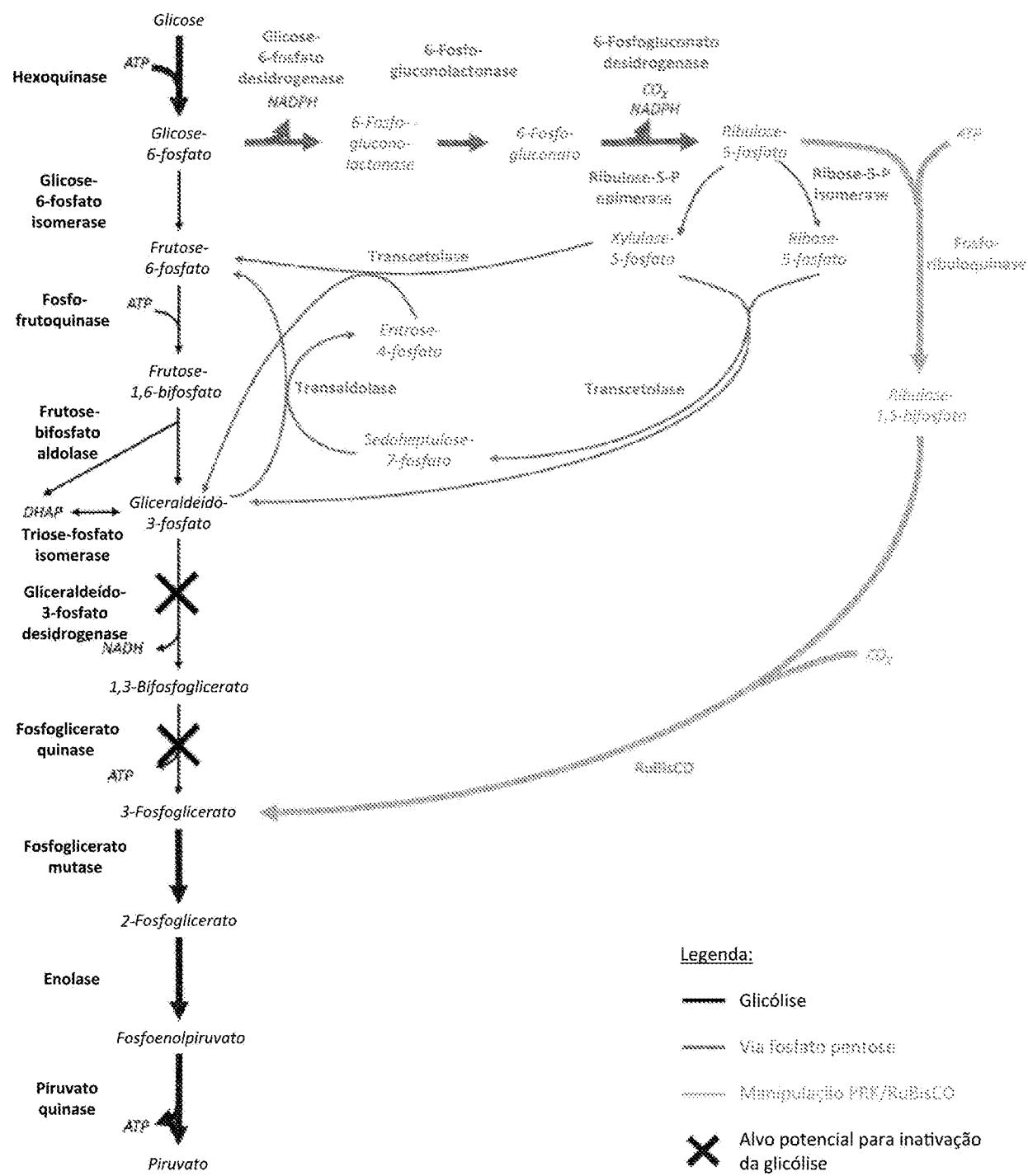


FIGURA 2

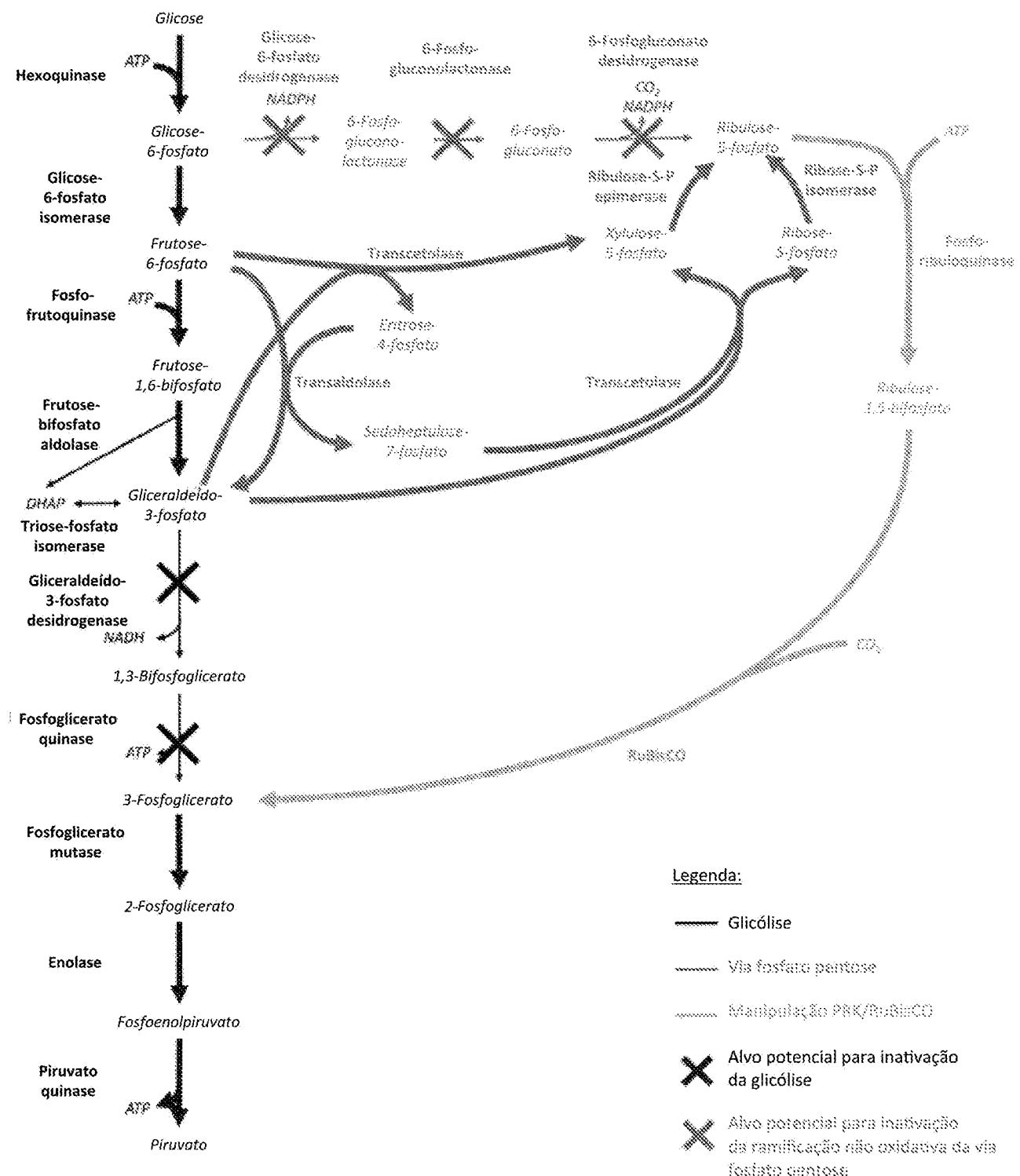


FIGURA 3

Resumo da Patente de Invenção para: **"MICRORGANISMO GENETICAMENTE OTIMIZADO PARA PRODUZIR MOLÉCULAS DE INTERESSE"**

A invenção se refere a um microrganismo geneticamente modificado expressando uma enzima RuBisCO funcional do tipo I ou II e uma fosforibuloquinase funcional (PRK), e na qual a via da glicólise é pelo menos parcialmente inibida, o referido microrganismo sendo geneticamente modificado de forma a produzir uma molécula exógena e/ou superproduzir uma molécula endógena. De acordo com a invenção, a ramificação oxidativa da via das pentoses-fosfato pode também ser pelo menos parcialmente inibida. A invenção também diz respeito ao uso de tal microrganismo geneticamente modificado para a produção ou superprodução de uma molécula de interesse e processos para a síntese ou bioconversão de moléculas de interesse.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: Listagem de Sequência F.12.010.PI-BR.txt
- Data de Geração do Código: 20/09/2019
- Hora de Geração do Código: 17:04:48
- Código de Controle:
 - Campo 1: 7EE6B3743E73A2A6
 - Campo 2: 7C7FF1ADC9D3B9CD