



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

**(11) PI 0816951-9 B1**



**(22) Data do Depósito:** 19/09/2008

**(45) Data de Concessão:** 17/01/2023

---

**(54) Título:** MÉTODO PARA PRODUZIR UM COMPOSTO ISOPRENÓIDE

**(51) Int.Cl.:** C12N 1/32; C12P 5/02; C12P 23/00; C12N 15/52.

**(30) Prioridade Unionista:** 20/09/2007 US 60/994790; 30/04/2008 US 61/049350.

**(73) Titular(es):** AMYRIS, INC..

**(72) Inventor(es):** HIROKO TSURUTA; JACOB R. LENIHAN; RIKA REGENTIN.

**(86) Pedido PCT:** PCT US2008010886 de 19/09/2008

**(87) Publicação PCT:** WO 2009/042070 de 02/04/2009

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 19/03/2010

**(57) Resumo:** MÉTODOS PARA PRODUZIR E PARA FABRICAR UM COMPOSTO ISOPRENÓIDE São aqui fornecidos métodos para uma produção robusta de isoprenóides via um ou mais caminhos biossintéticos. Também são aqui fornecidos ácidos nucleicos, enzimas, vetores de expressão, e células hospedeiras geneticamente modificadas para realizar os métodos objetos. Também são aqui fornecidos métodos de fermentação para a alta produtividade de isoprenóides a partir de células hospedeiras geneticamente modificadas.

## “MÉTODO PARA PRODUZIR UM COMPOSTO ISOPRENÓIDE”

### PEDIDOS RELACIONADOS ANTERIORES

Este pedido reivindica o benefício do Pedido Provisório U.S. N<sup>os</sup> 60/994.790, depositado em 20 de setembro de 2007 e 61/049.350, depositado em 30 de abril de 2008, todos os quais são aqui incorporados por referência em sua totalidade.

### CAMPO DA INVENÇÃO

São aqui fornecidos, entre outros, composições e métodos para uma produção robusta de isoprenóides. Também são aqui fornecidos ácidos nucleicos, enzimas, vetores de expressão e células hospedeiras geneticamente modificadas para realizar os métodos. Também são aqui fornecidos métodos de fermentação para a alta produtividade de isoprenóides a partir de células hospedeiras geneticamente modificadas.

### FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Os isoprenóides são ubíquos na natureza. Eles compreendem uma família diversa de mais de 40.000 produtos individuais, muitos dos quais são vitais para os organismos vivos. Os isoprenóides servem para manter a fluidez celular, transporte de elétrons e outras funções metabólicas. Um vasto número de isoprenóides naturais e sintéticos são úteis como produtos farmacêuticos, cosméticos, perfumes, pigmentos e corantes, fungicidas, anti-sépticos, nutracêuticos e intermediários químicos finos.

Um produto isoprenóide é tipicamente composto de cinco unidades de repetição de carbono de difosfato de isopentenila (IPP), embora isoprenóides e politerpenos irregulares tenham sido relatados. Na natureza, os isoprenóides são sintetizados pelas condensações consecutivas de seu precursor IPP e seu isômero pirofosfato de dimetilalila (DMAPP). Dois caminhos para estes precursores são conhecidos. Eucariotas, com a exceção de plantas, no geral usam o caminho dependente do mevalonato (MEV) para

converter a acetil coenzima A (acetil-CoA) para IPP, que é subsequentemente isomerizado para DMAPP. Procariotas, com algumas exceções, tipicamente utilizam apenas o caminho independente de mevalonato ou desoxixilulose-5-fosfato (DXP) para produzir IPP e DMAPP. As plantas usam tanto o caminho MEV quanto o caminho DXP. Ver Rohmer *et al.* (1993) *Biochem. J.* 295: 517-524; Lange *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(24): 13172-13177; Rohdich *et al.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 1158-1163.

Tradicionalmente, os isoprenóides têm sido fabricados pela extração a partir de fontes naturais tais como plantas, micróbios e animais. Entretanto, o rendimento por via de extração é usualmente muito baixo devido a várias limitações profundas. Primeiro, a maioria dos isoprenóides acumulam na natureza apenas em quantidades pequenas. Segundo, os organismos fonte no geral não são passíveis de cultivo em larga escala que é necessário para produzir quantidades comercialmente viáveis de um isoprenóide desejado. Terceiro, a exigência de certos solventes tóxicos para a extração de isoprenóide necessita de procedimentos de manuseio e descarte especiais e assim complicando a produção comercial de isoprenóides.

A elucidação dos caminhos metabólicos de MEV e DXP tem tornado a produção biossintética de isoprenóides praticável. Por exemplo, micróbios foram engendrados para superexpressar uma parte do caminho de mevalonato ou o mesmo inteiro para a produção de um isoprenóide chamado amorfa-4,11-dieno (Patentes U.S. Nos. 7.172.886 e 7.192.751). Outros esforços têm focalizado no equilíbrio da reunião de gliceraldeído-3-fosfato e piruvato ou no aumento da expressão da 1-desóxi-D-xilulose-5-fosfato sintase (dxs) e IPP isomerase (idi). Ver Farmer *et al.* (2001) *Biotechnol. Prog.* 17: 57-61; Kajiwarra *et al.* (1997) *Biochem. J.* 324: 421-426; e Kim *et al.* (2001) *Biotechnol. Bioeng.* 72: 408-415.

Não obstante, dada as quantidades muito grandes dos produtos de isoprenóide necessários para muitas aplicações comerciais, permanece uma

necessidade quanto a sistemas de expressão e procedimentos de fermentação que produzem ainda mais isoprenóides do que os disponíveis com as tecnologias correntes. O redirecionamento ótimo do metabolismo microbiano para a produção de isoprenóide requer que o caminho biossintético introduzido seja adequadamente engendrado tanto para convergir o carbono para a produção de isoprenóide eficientemente e para impedir a formação de níveis tóxicos de intermediários metabólicos em um período de tempo prolongado. São aqui fornecidos composições e métodos que tratam esta necessidade e forneçam também vantagens relacionadas.

## 10 SUMÁRIO DA INVENÇÃO

São aqui fornecidas composições e métodos para uma produção robusta de isoprenóides. Os exemplos não limitantes de isoprenóides adequados incluem: hemiterpenos (derivados de 1 unidade de isopreno) tal como isopreno; monoterpenos (derivados de 2 unidades de isopreno) tais como mirceno; sesquiterpenos (derivados de 3 unidades de isopreno) tais como amorfa-4,11-dieno; diterpenos (derivados de quatro unidades de isopreno) tais como taxadieno; triterpenos (derivados de 6 unidades de isopreno) tais como esqualeno; tetraterpenos (derivados de 8 isoprenóides) tais como  $\beta$ -caroteno; e politerpenos (derivados de mais do que 8 unidades de isopreno) tal como poliisopreno.

Em um aspecto, um método para produzir um composto isoprenóide é fornecido em que o método compreende:

a) obter uma pluralidade de células hospedeiras que sejam capazes de fabricar o composto isoprenóide que compreende uma sequência de ácido nucléico heteróloga cromossomicamente integrada que codifica uma enzima do caminho MEV ou DXP;

b) cultivar as células hospedeiras em um meio sob condições em que as células hospedeiras usem etanol como uma fonte de carbono e fabricar o composto isoprenóide; e

c) recuperar o composto isoprenóide do meio.

Em algumas formas de realização, o etanol que é consumido pelas células hospedeiras como a fonte de carbono é fabricado pela célula hospedeira. Em outras formas de realização, o etanol que é consumido pelas células hospedeiras como a fonte de carbono é exogenamente fornecido ao meio.

Em um outro aspecto, um método para fabricar um composto isoprenóide é fornecido que compreende:

a) obter uma pluralidade de células hospedeiras que sejam capazes de fabricar o composto isoprenóide;

b) cultivar as células hospedeiras em um meio que compreende etanol em uma quantidade igual a ou maior do que cerca de 1 grama por litro de meio por pelo menos quatro horas; e

c) recuperar o composto isoprenóide do meio.

Já em um outro aspecto, um método para fabricar um composto isoprenóide é fornecido que compreende:

a) obter uma pluralidade de células de levedura que sejam capazes de fabricar o composto isoprenóide;

b) cultivar as células de levedura para formar biomassa fornecendo-se um bolo de uma fonte de carbono ao meio;

c) manter as células sob condições por meio das quais as células de levedura têm uma taxa de consumo de etanol igual a ou maior do que cerca de 0,01 grama por etanol por grama de peso de célula seca por hora por pelo menos quatro horas; e

d) recuperar o composto isoprenóide do meio.

Em algumas formas de realização, as células hospedeiras fabricam o composto isoprenóide usando o caminho de MEV. Em outras formas de realização, as células hospedeiras fabricam o composto isoprenóide usando o caminho de DXP.

Em outras formas de realização, as células hospedeiras são cultivadas ou mantidas por pelo menos algum período de tempo sob condições limitadas em oxigênio. Ainda em outras formas de realização, as células hospedeiras são cultivadas ou mantidas por pelo menos algum período de tempo sob condições limitadas em fosfato.

### INCORPORAÇÃO POR REFERÊNCIA

Todas as publicações e pedidos de patente mencionados neste relatório descritivo são aqui incorporados por referência até o mesmo grau como se cada publicação ou pedido de patente individuais fossem específica e individualmente indicados como sendo incorporados por referência.

### DESCRIÇÃO RESUMIDA DOS DESENHOS

A Figura 1 é uma representação esquemática do caminho de mevalonato (“MEV”) para a produção de pirofosfato de isopentenila (“IPP”).

A Figura 2 é uma representação esquemática do caminho da 1-desóxi-D-xilulose 5-difosfato (“DXP”) para a produção de pirofosfato de isopentenila (“IPP”) e pirofosfato de dimetilalila (“DMAPP”). Dxs é a 1-desóxi-D-xilulose-5-fosfato sintase; Dxr é a 1-desóxi-D-xilulose-5-fosfato redutoisomerase (também conhecida como IspC); IspD é a 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol sintase; IspE é a 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol sintase; IspF é a 2,4-ciclodifosfato de 2C-metil-D-eritritol sintase; IspG é a 4-difosfato de 1-hidróxi-2-metil-2-(E)-butenila sintase (IspG); e ispH é a isopentenil/dimetilalil difosfato sintase.

A Figura 3 é uma representação esquemática da conversão de pirofosfato de isopentenila (“IPP”) e pirofosfato de dimetilalila (“DMAPP”) para pirofosfato de geranila (“GPP”), pirofosfato de farnesila (“FPP”) e pirofosfato de geranilgeranila (“GGPP”) e a síntese de vários isoprenóides.

A Figura 4 mostra mapas de fragmentos de DNA ERG20- $P_{GAL}$ -tHMGR (a), ERG13- $P_{GAL}$ -tHMGR (B), IDII- $P_{GAL}$ -tHMGR (C), ERG10- $P_{GAL}$ -ERG12 (D), ERG8- $P_{GAL}$ -ERG19 (E), GAL74 a 1021-HPH-GAL11637 a

2587 (F), GAL80-50 a -1-NatR- GAL801309 a 1358 (G) e GAL11 a 48-NatR-GAL11500 a 1550 (H).

A Figura 5 mostra um mapa de plasmídeo pAM404.

5 A Figura 6 mostra o crescimento de célula e a produção de amorfa-4,11-dieno (AD) pela cepa Y337 sob restrição de carbono usando uma alimentação de glicose ou uma alimentação mista de glicose/etanol.

10 A Figura 7A mostra um diagrama de um algoritmo de alimentação de controle de CO<sub>2</sub>. A Figura 7B mostra a taxa de evolução do dióxido de carbono, liberação de substrato, crescimento e produção de amorfa-4,11-dieno pela cepa Y293 usando uma alimentação pulsada de etanol.

15 A Figura 8 mostra o crescimento de célula e produção de amorfa-4,11-dieno pela cepa Y293 sob restrição de carbono usando uma alimentação de glicose concentrada para o crescimento inicial seguido por uma alimentação de etanol à produção.

20 As Figuras 9A até 9E mostram a produção/consumo de etanol, taxa de alimentação, crescimento, evolução de carbono e taxas de utilização de oxigênio e produção de farneseno pela cepa Y677 no lote alimentado, fermentação restrita em carbono com um etanol alimentado apenas na presença ou ausência de oleato de metila.

As Figuras 10A até 10D mostram a concentração de oxigênio dissolvido, crescimento, produção/consumo de etanol e produção de amorfa-4,11-dieno pela cepa Y283 em graus diferentes de limitação de oxigênio.

25 As Figuras 10E até 10G mostram o crescimento, produção/consumo de etanol e produção de farneseno pela cepa Y352 em graus diferentes de limitação de oxigênio.

A Figura 11 mostra a produtividade de amorfa-4,11-dieno por célula pela cepa Y337 em frascos agitados sob restrição de carbono com concentrações variáveis de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

A Figura 12 mostra uma alimentação de fermentador de lote alimentado (A) e crescimento de célula (B) e produção de amorfa-4,11-dieno (C) pela cepa Y337 sob restrição de carbono e fosfato usando uma alimentação de glicose.

5 A Figura 13 mostra o crescimento de célula (A) e produção de amorfa-4,11-dieno (B) pela cepa Y337 sob restrição de carbono e fosfato usando uma alimentação mista de glicose/etanol.

A Figura 14 ilustra a geração de sequências de específicas de local genômico de 100 nucleotídeos de comprimento que flanqueiam cassetes de promotor-gene-FRT-Kan-FRT úteis na integração de sequências de nucleotídeo heterólogas no genoma de *Escherichia coli*.

A Figura 15 mostra um mapa do plasmídeo pAM618.

## DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

### Definições

15 A menos que de outro modo definido, todos os termos técnicos e científicos aqui usados têm o mesmo significado como habitualmente entendido por uma pessoa de habilidade comum na técnica. Referência é feita aqui aos vários termos que devem ser definidos ter os seguintes significados:

Os termos “opcional” ou “opcionalmente” significam que a característica ou estrutura subsequentemente descritas podem estar presentes ou não ou que o evento ou circunstância subsequentemente descritos podem ocorrer ou não e que a descrição inclui casos onde uma característica ou estrutura particulares estão presentes e casos onde a característica ou estrutura estão ausentes ou casos onde o evento ou circunstância ocorrem e casos onde  
20 o evento ou circunstância não ocorrem.  
25

O termo “caminho metabólico” é aqui usado para se referir a um caminho metabólico ou um caminho anabólico. Os caminhos anabólicos envolvem construir uma moléculas maior de moléculas menores, um processo que requer energia. Os caminhos metabólicos envolvem a decomposição de

moléculas maiores, frequentemente liberando energia.

Os termos “caminho do mevalonato” ou “caminho de MEV” são aqui usados para se referir ao caminho biossintético que converte acetil-CoA para IPP. O caminho de MEV é ilustrado esquematicamente na Figura 1.

O termo “caminho da desoxixilulose 5-fosfato” ou “caminho de DXP” é aqui usado para se referir ao caminho que converte gliceraldeído-3-fosfato e piruvato ao IPP e DMAPP. O caminho de DXP é ilustrado esquematicamente na Figura 2.

A palavra “pirofosfato” é usado aqui intercambiavelmente com “difosfato”.

Os termos “vetor de expressão” ou “vetor” referem-se a um ácido nucléico que transduz, transforma ou infecta uma célula hospedeira, fazendo com que desse modo a célula produza ácidos nucléicos e/ou proteínas outros que não aqueles que são nativos para a célula ou expressem ácidos nucléicos e/ou proteínas em uma maneira que não é nativa para a célula.

O termo “endógeno” refere-se a uma substância ou processo que ocorre naturalmente, por exemplo, em uma célula hospedeira não recombinante.

Os termos “caminho enzimático para fabricar pirofosfato de isopentenila” refere-se a qualquer caminho capaz de produzir pirofosfato de isopentila, incluindo, sem limitação, o caminho do mevalonato ou o caminho de DXP.

O termo “ácido nucléico” refere-se a uma forma polimérica de nucleotídeos de qualquer comprimento, ribonucleotídeos ou desóxi-nucleotídeos. Assim, este termo inclui, mas não é limitado a, DNA ou RNA de filamento único, duplo ou múltiplo, DNA genômico, cDNA, híbridos de DNA-RNA ou um polímero que compreende bases de purina e pirimidina ou outras bases de nucleotídeo naturais, química ou bioquimicamente modificadas, não naturais ou derivatizadas.

O termo “operon” é usado para se referir a duas ou mais sequências de nucleotídeo contíguas que cada uma codifica um produto de gene tal como um RNA ou uma proteína e a expressão dos quais são coordenadamente reguladas por um ou mais elementos de controle (por exemplo, um promotor).

O termo “produto de gene” refere-se ao RNA codificado pelo DNA (ou vice versa) ou proteína que é codificada por um RNA ou DNA, onde um gene tipicamente compreenderá uma ou mais sequências de nucleotídeo que codificam uma proteína e também podem incluir introns e outras sequências não codificadoras de nucleotídeo.

O termo “proteína” refere-se a uma forma polimérica de aminoácidos de qualquer comprimento, que pode incluir aminoácidos codificados e não codificados, aminoácidos química ou bioquimicamente modificados ou derivatizados e polipeptídeos tendo cadeias principais de peptídeo modificadas.

O termo “ácido nucléico heterólogo” como aqui usado refere-se a um ácido nucléico em que pelo menos um dos seguinte é verdadeiro: (a) o ácido nucléico é estranho (“exógeno”) a (isto é, não encontrado naturalmente em) uma dada célula hospedeira; (b) o ácido nucléico compreende uma sequência de nucleotídeo que é naturalmente encontrada em (isto é, é “endógena a”) uma dada célula hospedeira, mas a sequência de nucleotídeo é produzida em uma quantidade não natural (por exemplo, maior do que a esperada ou maior do que a naturalmente encontrada) na célula; (c) o ácido nucléico compreende uma sequência de nucleotídeo que difere em sequência de uma sequência de nucleotídeo endógena, mas a sequência de nucleotídeo codifica a mesma proteína (tendo a mesma ou substancialmente a mesma sequência de aminoácido) e é produzida em uma quantidade não natural (por exemplo, maior do que a esperada ou maior do que a naturalmente encontrada) na célula; ou (d) o ácido nucléico compreende duas

ou mais sequências de nucleotídeo que não são encontradas na mesma relação entre si na natureza (por exemplo, o ácido nucléico é recombinante).

Um “transgene” refere-se a um gene que é exogenamente introduzido em uma célula hospedeira. Este pode compreender um ácido nucléico endógeno ou exógeno ou heterólogo.

O termo “hospedeiro recombinante” (também aludido como uma “célula hospedeira geneticamente modificada” ou “microorganismo hospedeiro geneticamente modificado”) denota uma célula hospedeira que compreende um ácido nucléico heterólogo aqui fornecido.

O termo “ácido nucléico exógeno” refere-se a um ácido nucléico que é exogenamente introduzido em uma célula hospedeira e consequentemente não é normal ou naturalmente encontrada em e/ou produzida por uma dada célula na natureza.

O termo “elemento regulador” refere-se às sequências de controle transcricionais e traducionais, tais como promotores, realçadores, sinais de poliadenilação, terminadores, sinais de degradação de proteína e outros, que fornecem e/ou regulam a expressão de uma sequência codificadora e/ou produção de um polipeptídeo codificado em uma célula hospedeira.

O termo “transformação” refere-se a uma mudança genética permanente ou transitória induzida em uma célula a seguir da introdução de novo ácido nucléico. A mudança genética (“modificação”) pode ser realizada pela incorporação do novo DNA no genoma da célula hospedeira ou pela manutenção transitória ou estável do novo DNA como um elemento epissômico. Nas células eucarióticas, uma mudança genética permanente é no geral obtida pela introdução do DNA no genoma da célula. Nas células procarióticas, uma mudança genética permanente pode ser introduzida no cromossoma ou via elementos extracromossômicos tais como plasmídeos e vetores de expressão, que podem conter um ou mais marcadores selecionáveis

para ajudar na sua manutenção na célula hospedeira recombinante.

O termo “operavelmente ligado” refere-se a uma justaposição em que os componentes assim descritos estão em uma relação que os permita funcionar na sua maneira pretendida. Por exemplo, um promotor é operavelmente ligado a uma sequência de nucleotídeo se o promotor afeta a transcrição ou expressão da sequência de nucleotídeo.

O termo “célula hospedeira” e “microorganismo hospedeiro” são usados intercambiavelmente aqui para se referir a qualquer célula viva archae, bacteriana ou eucariótica dentro da qual um ácido nucléico heterólogo pode ser ou foi inserido. O termo também diz respeito à progênie da célula original, que pode não ser de modo necessário completamente idêntica em morfologia ou em complemento genômico ou de DNA total ao precursor original, devido à mutação natural, acidental ou deliberada.

O termo “sintético” como usado em referência aos ácidos nucléicos significa o recozimento de blocos de construção de oligonucleotídeo quimicamente sintetizados para formar segmentos de gene, que são depois enzimaticamente montados para construir o gene inteiro. A síntese de ácidos nucléicos por intermédio de “meios químicos” significa que os nucleotídeos componentes foram montados *in vitro*.

O termo “natural” como aplicado a um ácido nucléico, uma célula ou um organismo, refere-se a um ácido nucléico, célula ou organismo que é encontrado na natureza. Por exemplo, um polipeptídeo ou sequência de polinucleotídeo que estejam presentes em um organismo não patológico (não de doença) que pode ser isolado a partir de uma fonte na natureza e que não foi intencionalmente modificado por um ser humano no laboratório é natural.

O termo “que ocorrem naturalmente” como aplicado a um ácido nucléico, uma enzima, uma célula ou um organismo, refere-se a um ácido nucléico, enzima, célula ou organismo que é encontrado na natureza. Por exemplo, um polipeptídeo ou sequência de polinucleotídeo que estejam

presentes em um organismo que pode ser isolado a partir de uma fonte na natureza e que não foi intencionalmente modificado por um ser humano no laboratório é que ocorrem naturalmente.

O termo “fragmento biologicamente ativo” como aplicado a uma proteína, polipeptídeo ou enzima refere-se a(s) porção(ões) funcional(is) das proteínas ou polipeptídeo ou enzima. As sequências de aminoácido variantes funcionalmente equivalentes podem surgir, por exemplo, como uma consequência da redundância e equivalência funcional de códon que são conhecidas ocorrer naturalmente dentro das sequências de ácidos nucléico e das proteínas assim codificadas. Proteínas ou peptídeos funcionalmente equivalentes podem ser alternativamente construídos por intermédio da aplicação da tecnologia de DNA recombinante, em que mudanças na estrutura da proteína podem ser engendradas, com base nas considerações da propriedade dos aminoácidos que são trocados.

Os termos “isoprenóide”, “composto isoprenóide”, “produto isoprenóide”, “terpeno”, “composto de terpeno”, “terpenóide” e “composto terpenóide” são aqui usados intercambiavelmente. Eles referem-se aos compostos que são capazes de ser derivados de IPP.

As formas singulares “um(a),” “e,” e “o(a)” incluem referentes plurais a menos que o contexto claramente dite de outro modo. Assim, por exemplo, referência a “um vetor de expressão” inclui um único vetor de expressão assim como uma pluralidade de vetores de expressão e referência a “a célula hospedeira” inclui referência a uma ou mais células hospedeiras e assim por diante. É ainda mencionado que as reivindicações podem ser traçadas para excluir qualquer elemento opcional. Como tal, esta declaração é intencionada a servir como base antecedente para o uso de tal terminologia exclusiva como “unicamente,” “apenas” e outros em conexão com a recitação de elementos reivindicados ou o uso de uma limitação “negativa”.

A menos que de outro modo indicado, as formas de realização

são aqui fornecidas não limitadas às sequências, vetores de expressão, enzimas, microorganismos hospedeiros ou processos particulares, visto que tais podem variar de acordo com o entendimento daqueles de habilidade comum na técnica em vista da divulgação aqui. A terminologia aqui usada é apenas para os propósitos de descrever formas de realização particulares e não é intencionada a ser limitante.

#### Caminhos de IPP

As células hospedeiras aqui fornecidas compreendem ou utilizam o caminho de MEV, o caminho de DXP ou ambos para sintetizar IPP e seu isômero, DMAPP. É aqui fornecida é célula hospedeira incluindo pelo menos uma sequência de ácido nucléico heteróloga cromossomicamente integrada que codifica uma enzima dos caminhos MEV ou DXP. Em outras formas de realização, a célula hospedeira inclui pelo menos uma sequência de ácido nucléico heteróloga que codifica uma pluralidade de enzimas dos caminhos MEV ou DXP. Ainda em outras formas de realização, a célula hospedeira inclui uma pluralidade de sequências de ácido nucléico heterólogas que codifica todas as enzimas do caminho de MEV. Já em outras formas de realização, a célula hospedeira inclui uma pluralidade de sequências de ácido nucléico heterólogas que codificam todas as enzimas do caminho de DXP.

No geral, eucariotas outros que não plantas usam o caminho do isoprenóide MEV exclusivamente para converter acetil-CoA a IPP, que é subsequentemente isomerizado a DMAPP. Procariotas, com algumas exceções, usam o caminho independente de mevalonato ou DXP para produzir IPP e DMAPP separadamente através de um ponto de ramificação. As plantas usam tanto o caminho de MEV quanto de DXP para a síntese de IPP.

#### Caminho de MEV

Uma representação esquemática do caminho de MEV é

descrito na Figura 1. No geral, o caminho compreende seis etapas.

Na primeira etapa, duas moléculas de acetil-coenzima A são enzimaticamente combinadas para formar acetoacetil-CoA. Uma enzima conhecida por catalisar esta etapa é, por exemplo, a acetil-CoA tiolase (também conhecidas como acetil-CoA acetiltransferase). Exemplos ilustrativos de sequências de nucleotídeo incluem mas não são limitados aos seguintes números de acesso do GenBank e os organismos a partir dos quais as sequências derivaram: (NC\_000913 REGIÃO: 2324131..2325315; *Escherichia coli*, (D49362; *Paracoccus denitrificans*) e (L20428; *Saccharomyces cerevisiae*).

Na segunda etapa do caminho de MEV, a acetoacetil-CoA é enzimaticamente condensada com uma outra molécula de acetil-CoA para formar 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA). Uma enzima conhecida por catalisar esta etapa é, por exemplo, a HMG-CoA sintase. Os exemplos ilustrativos de sequências de nucleotídeo incluem mas não são limitados a: (NC\_001145. complemento 19061..20536; *Saccharomyces cerevisiae*), (X96617; *Saccharomyces cerevisiae*), (X83882; *Arabidopsis thaliana*), (AB037907; *Kitasatospora griseola*), (BT007302; *Homo sapiens*) e (NC\_002758, rótulo de local SAV2546, GeneID 1122571; *Staphylococcus aureus*).

Na terceira etapa, HMG-CoA é enzimaticamente convertida para mevalonato. Uma enzima conhecida catalisar esta etapa é, por exemplo, a HMG-CoA redutase. Os exemplos ilustrativos de sequências de nucleotídeo incluem mas não são limitados a: (NM\_206548; *Drosophila melanogaster*), (NC\_002758, Rótulo de local SAV2545, GeneID 1122570; *Staphylococcus aureus*), (NM\_204485; *Gallus gallus*), (AB015627; *Streptomyces* sp. KO 3988), (AF542543; *Nicotiana attenuata*), (AB037907; *Kitasatospora griseola*), (AX128213, que fornece a sequência que codifica um HIMGR truncado; *Saccharomyces cerevisiae*) e (NC\_001145: complemento

(115734..118898; *Saccharomyces cerevisiae*).

Na quarta etapa, mevalonato é enzimaticamente fosforilado para formar mevalonato 5-fosfato. Uma enzima conhecida por catalisar esta etapa é, por exemplo, a mevalonato cinase. Os exemplos ilustrativos de sequências de nucleotídeo incluem mas não são limitados a: (L77688; *Arabidopsis thaliana*) e (X55875; *Saccharomyces cerevisiae*).

Na quinta etapa, um segundo grupo de fosfato é enzimaticamente adicionado ao mevalonato 5-fosfato para formar o mevalonato 5-pirofosfato. Uma enzima conhecida por catalisar esta etapa é, por exemplo, a fosfomevalonato cinase. Os exemplos ilustrativos de sequências de nucleotídeo incluem mas não são limitados a: (AF429385; *Hevea brasiliensis*), (NM\_006556; *Homo sapiens*) e (NC\_001145. complemento 712315..713670; *Saccharomyces cerevisiae*).

Na sexta etapa, o mevalonato 5-pirofosfato é enzimaticamente convertido em IPP. Uma enzima conhecida por catalisar esta etapa é, por exemplo, a mevalonato pirofosfato descarboxilase. Os exemplos ilustrativos de sequências de nucleotídeo incluem mas não são limitados a: (X97557; *Saccharomyces cerevisiae*), (AF290095; *Enterococcus faecium*) e (U49260; *Homo sapiens*).

Se IPP deve ser convertido a DMAPP, então uma sétima etapa é requerida. Uma enzima conhecida por catalisar esta etapa é, por exemplo, a IPP isomerase. Os exemplos ilustrativos de sequências de nucleotídeo incluem mas não são limitados a: (NC\_000913, 3031087..3031635; *Escherichia coli*) e (AF082326; *Haematococcus pluvialis*). Se a conversão para DMAPP é requerida, uma expressão aumentada de IPP isomerase garante que a conversão de IPP em DMAPP não represente uma etapa limitante de taxa no caminho global.

### Caminho DXP

Uma representação esquemática do caminho de DXP é

descrita na Figura 2. No geral, o caminho de DXP compreende sete etapas. Na primeira etapa, o piruvato é condensado com D-gliceraldeído 3-fosfato para fabricar 1-desóxi-D-xilulose-5-fosfato. Uma enzima conhecida por catalisar esta etapa é, por exemplo, a 1-desóxi-D-xilulose-5-fosfato sintase. Os exemplos ilustrativos de sequências de nucleotídeo incluem mas não são limitados a: (AF035440; *Escherichia coli*), (NC\_002947, rótulo de local PP0527; *Pseudomonas putida* KT2440), (CP000026, rótulo de local SPA2301; *Salmonella* entérica *Paratyphi*, ver ATCC 9150), (NC\_007493, rótulo de local RSP\_0254; *Rhodobacter sphaeroides* 2,4.1), (NC\_005296, rótulo de local RPA0952; *Rhodopseudomonas palustris* CGA009), (NC\_004556, rótulo de local PD 1293; *Xilella fastidiosa* Temeculal) e (NC\_003076, rótulo de local AT5G11380; *Arabidopsis thaliana*).

Na segunda etapa, 1-desóxi-D-xilulose-5-fosfato é convertido a 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato. Uma enzima conhecida por catalisar esta etapa é, por exemplo, 1-desóxi-D-xilulose-5-fosfato redutoisomerase. Os exemplos ilustrativos de sequências de nucleotídeo incluem mas não são limitados a: (AB013300; *Escherichia coli*), (AF148852; *Arabidopsis thaliana*), (NC\_002947, rótulo de local PP1597; *Pseudomonas putida* KT2440), (AL939124, rótulo de local SCO5694; *Streptomyces coelicolor* A3(2)), (NC\_007493, rótulo de local RSP\_2709; *Rhodobacter sphaeroides* 2,4.1) e (NC\_007492, rótulo de local Pfl\_1107; *Pseudomonas fluorescens* NO-1).

Na terceira etapa, 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato é convertido ao 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol. Uma enzima conhecida por catalisar esta etapa é, por exemplo, a 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol sintase. Os exemplos ilustrativos de sequências de nucleotídeo incluem mas não são limitados a: (AF230736; *Escherichia coli*), (NC\_007493, rótulo de local RSP\_2835; *Rhodobacter sphaeroides* 2,4.1), (NC\_003071, rótulo de local AT2G02500; *Arabidopsis thaliana*) e (NC\_002947, rótulo de local PP1614;

*Pseudomonas putida* KT2440).

Na quarta etapa, 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol é convertido a 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol-2-fosfato. Uma enzima conhecida por catalisar esta etapa é, por exemplo, a 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol cinase. Os exemplos ilustrativos de sequências de nucleotídeo incluem mas não são limitados a: (AF216300; *Escherichia coli*) e (NC\_007493, rótulo de local RSP\_1779; *Rhodobacter sphaeroides* 2,4.1).

Na quinta etapa, 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol-2-fosfato é convertido ao 2C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato. Uma enzima conhecida por catalisar esta etapa é, por exemplo, a 2C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato sintase. Os exemplos ilustrativos de sequências de nucleotídeo incluem mas não são limitados a: (AF230738; *Escherichia coli*), (NC\_007493, rótulo de local RSP\_6071; *Rhodobacter sphaeroides* 2,4.1) e (NC\_002947, rótulo de local PP1618; *Pseudomonas putida* KT2440).

Na sexta etapa, 2C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato é convertido ao 1-hidróxi-2-metil-2-(E)-butenil-4-difosfato. Uma enzima conhecida por catalisar esta etapa é, por exemplo, 1-hidróxi-2-metil-2-(E)-butenil-4-difosfato sintase. Os exemplos ilustrativos de sequências de nucleotídeo incluem mas não são limitados a: (AY033515; *Escherichia coli*), (NC\_002947, rótulo de local PP0853; *Pseudomonas putida* KT2440) e (NC\_007493, rótulo de local RSP\_2982; *Rhodobacter sphaeroides* 2,4.1).

Na sétima etapa, 1-hidróxi-2-metil-2-(E)-butenil-4-difosfato é convertido em IPP ou no seu isômero, DMAPP. Uma enzima conhecida por catalisar esta etapa é, por exemplo, a isopentil/dimetilalil difosfato sintase. Os exemplos ilustrativos de sequências de nucleotídeo incluem mas não são limitados a: (AY062212; *Escherichia coli*) e (NC\_002947, rótulo de local PP0606; *Pseudomonas putida* KT2440).

Em algumas formas de realização, “conversa cruzada” (ou interferência) entre os processos próprios da célula hospedeira e aqueles

processos envolvidos com a produção de IPP como são aqui fornecidos minimizados ou totalmente eliminados. Por exemplo, a conversa cruzada é minimizada ou totalmente eliminada quando o microorganismo hospedeiro conta exclusivamente com o caminho de DXP para sintetizar IPP e um  
 5 caminho MEV é introduzido para fornecer IPP adicional. Um tal organismo hospedeiro não seria equipado para alterar a expressão das enzimas do caminho de MEV ou processar os intermediários associados com o caminho de MEV. Os organismos que contam exclusiva ou predominantemente com o caminho de DXP incluem, por exemplo, *Escherichia coli*.

10 Em algumas formas de realização, a célula hospedeira produz IPP por intermédio do caminho de MEV, exclusivamente ou em combinação com o caminho de DXP. Em outras formas de realização, um caminho de DXP hospedeiro é funcionalmente invalidado de modo que a célula hospedeira produza IPP exclusivamente através de um caminho de MEV  
 15 heterologamente introduzido. O caminho de DXP pode ser funcionalmente invalidado pela invalidação da expressão de gene ou inativando a função de uma ou mais das enzimas do caminho de DXP.

#### Células hospedeiras

Os exemplos ilustrativos de células hospedeiras adequadas  
 20 para o uso aqui fornecido incluem qualquer célula archae, procariótica ou eucariótica. Os exemplos de uma célula archae incluem, mas não são limitados a aqueles pertencentes aos gêneros: *Aeropyrum*, *Archaeoglobus*, *Halobacterium*, *Methanococcus*, *Methanobacterium*, *Pirococcus*, *Sulfolobus* e *Thermoplasma*. Os exemplos ilustrativos de cepas de archae incluem mas não  
 25 são limitados a: *Aeropyrum pernix*, *Archaeoglobus fulgidus*, *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium therm oautotrophicum*, *Pirococcus abyssi*, *Pirococcus horikoshii*, *Thermoplasma acidophilum*, *Thermoplasma volcanium*.

Os exemplos de uma célula procariótica incluem, mas não são

limitados a aqueles pertencentes aos gêneros: *Agrobacterium*,  
*Aliciclobacillus*, *Anabaena*, *Anacystis*, *Arthrobacter*, *Azobacter*, *Bacillus*,  
*Brevibacterium*, *Chromatium*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Enterobacter*,  
*Erwinia*, *Escherichia*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Mesorhizobium*,  
5 *Metilobacterium*, *Microbacterium*, *Phormidium*, *Pseudomonas*, *Rhodobacter*,  
*Rhodopseudomonas*, *Rhodospirillum*, *Rhodococcus*, *Salmonella*,  
*Scenedesmun*, *Serratia*, *Shigella*, *Staphlococcus*, *Streptomyces*, *Synnecoccus*  
e *Zymomonas*.

Os exemplos ilustrativos de cepas bacterianas procarióticas  
10 incluem mas não são limitados a: *Bacillus subtilis*, *Bacillus amiloliquefacines*,  
*Brevibacterium ammoniagenes*, *Brevibacterium immariophilum*, *Clostridium*  
*beigerinckii*, *Enterobacter sakazakii*, *Escherichia coli*, *Lactococcus lactis*,  
*Mesorhizobium loci*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas mevalonii*,  
*Pseudomonas pudica*, *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodobacter sphaeroides*,  
15 *Rhodospirillum rubrum*, *Salmonella enterica*, *Salmonella typhi*, *Salmonella*  
*typhimurium*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*,  
*Staphilococcus aureus* e outros.

No geral, se uma célula hospedeira bacteriana é usada, uma  
cepa não patogênica é preferida. Os exemplos ilustrativos de cepas não  
20 patogênicas incluem mas não são limitados a: *Bacillus subtilis*, *Escherichia*  
*coli*, *Lactibacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Pseudomonas*  
*aeruginosa*, *Pseudomonas mevalonii*, *Pseudomonas pudita*, *Rhodobacter*  
*sphaeroides*, *Rodobacter capsulatus*, *Rhodospirillum rubrum* e outros.

Os exemplos de células eucarióticas incluem mas não são  
25 limitados às células fúngicas. Os exemplos de célula fúngica incluem, mas  
não são limitados àquelas pertencentes aos gêneros: *Aspergillus*, *Candida*,  
*Chrysosporium*, *Cryotococcus*, *Fusarium*, *Kluyveromyces*, *Neotyphodium*,  
*Neurospora*, *Penicillium*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Trichoderma* e  
*Xanthophillomyces* (antigamente *Phaffia*).

Os exemplos ilustrativos de cepas eucarióticas incluem mas não são limitados a: *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Candida albicans*, *Chrysosporium lucknowense*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium venenatum*, *Kluyveromyces lactis*, *Neurospora crassa*, *Pichia angusta*, *Pichia finlandica*, *Pichia kodamae*, *Pichia membranefaciens*, *Pichia metanolica*, *Pichia opuntiae*, *Pichia pastoris*, *Pichia pijperi*, *Pichia quercuum*, *Pichia salictaria*, *Pichia thermotolerans*, *Pichia trehalophila*, *Pichia stipitis*, *Streptomyces ambofaciens*, *Streptomyces aureofaciens*, *Streptomyces aureus*, *Saccaromyces bayanus*, *Saccaromyces bouldardi*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Streptomyces fungoscidicus*, *Streptomyces griseochromogenes*, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces olivogriseus*, *Streptomyces rameus*, *Streptomyces tanashiensis*, *Streptomyces vinaceus*, *Trichoderma reesei* e *Xanthophillomyces dendrorhous* (antigamente *Phaffia rhodozyma*).

No geral, se uma célula eucariótica é usada, uma cepa não patogênica é preferida. Os exemplos ilustrativos de cepas não patogênicas incluem mas não são limitados a: *Fusarium graminearum*, *Fusarium venenatum*, *Pichia pastoris*, *Saccaromyces bouldardi* e *Saccaromyces cerevisiae*.

Além disso, certas cepas foram designados pelo Food and Drug Administration como GRAS ou No Geral Consideradas Como Seguras. Estas cepas incluem: *Bacillus subtilis*, *Lactibacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus* e *Saccharomyces cerevisiae*.

#### Compostos isoprenóides

As células hospedeiras aqui fornecidas são usadas para fabricar isoprenóides. Os compostos de isoprenóide específicos são fabricados de IPP ou DMAPP e podem requerer enzimas de acabamento adicionais. Os exemplos não limitantes de isoprenóides adequados incluem: hemiterpenos (derivados de 1 unidade de isopreno) tais como isopreno; monoterpenos

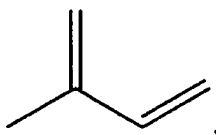
(derivados de 2 unidades de isopreno) tais como mirceno; sesquiterpenos (derivados de 3 unidades de isopreno) tais como amorf-4,11-dieno; diterpenos (derivados de quatro unidades de isopreno) tais como taxadieno; triterpenos (derivados de 6 unidades de isopreno) tais como esqualeno; 5 tetraterpenos (derivados de 8 isoprenóides) tais como  $\beta$ -caroteno; e politerpenos (derivados de mais do que 8 unidades de isopreno) tais como poliisopreno. Em algumas formas de realização, o isoprenóide não é um carotenóide. Em outras formas de realização, o isoprenóide é um isoprenóide C<sub>5</sub>-C<sub>20</sub>. Os exemplos ilustrativos de específica composto isoprenóides C<sub>5</sub>-C<sub>20</sub> 10 e suas respectivas enzimas de acabamento são descritos ainda abaixo.

### Compostos C<sub>5</sub>

Os compostos C<sub>5</sub> aqui fornecidos no geral são derivados de IPP ou DMAPP. Estes compostos também são conhecidos como hemiterpenos porque eles são derivados de uma única unidade de isopreno 15 (IPP ou DMAPP).

### Isopreno

Isopreno, cuja estrutura é



é encontrado em muitas plantas. Isopreno é fabricado de IPP pela isopreno sintase. Os exemplos ilustrativos de sequências de nucleotídeo 20 adequadas incluem mas não são limitados a: (AB198190; *Populus alba*) e (AJ294819; *Populus alba* x *Populus tremula*).

### Compostos C<sub>10</sub>

Os compostos C<sub>10</sub> aqui fornecidos no geral derivados de geranyl pirofosfato (GPP) que é fabricado pela condensação de IPP com 25 DMAPP. Uma enzima conhecida por catalisar esta etapa é, por exemplo, a geranyl pirofosfato sintase. Estes compostos C<sub>10</sub> também são conhecidos como

monoterpenos porque eles são derivados de duas unidades de isopreno.

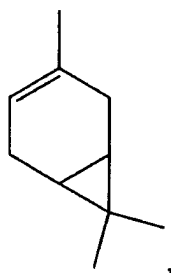
A Figura 3 mostra esquematicamente como IPP e DMAPP podem produzir GPP, que pode ser processado ainda a um monoterpeneo.

Os exemplos ilustrativos de sequências de nucleotídeo para a geranyl pirofosfato sintase incluem mas não são limitados a: (AF513111; *Abies grandis*), (AF513112; *Abies grandis*), (AF513113; *Abies grandis*), (AY534686; *Antirrhinum majus*), (AY534687; *Antirrhinum majus*), (Y17376; *Arabidopsis thaliana*), (AE016877, Local AP11092; *Bacillus cereus*; ATCC 14579), (AJ243739; *Citrus sinensis*), (AY534745; *Clarkia breweri*), (AY953508; *Ips pini*), (DQ286930; *Lycopersicon esculentum*), (AF182828; *Mentha x piperita*), (AF182827; *Mentha x piperita*), (MPI249453; *Mentha x piperita*), (PZE431697, Local CAD24425; *Paracoccus zeaxanthinifaciens*), (AY866498; *Picrorhiza kurrooa*), (AY351862; *Vitis vinifera*) e (AF203881, Local AAF12843; *Zymomonas mobilis*).

GPP é depois subsequentemente convertido a uma variedade de compostos C<sub>10</sub>. Os exemplos ilustrativos de compostos C<sub>10</sub> incluem mas não são limitados:

#### Careno

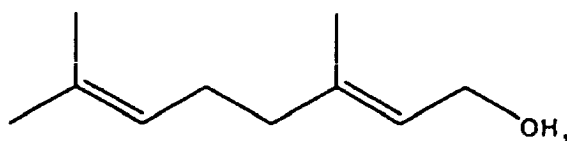
Careno, cuja estrutura é



é encontrado na resina de muitas árvores, particularmente pinheiros. Careno é fabricado de GPP a partir da careno sintase. Os exemplos ilustrativos de sequências de nucleotídeo adequados incluem mas não são limitados a: (AF461460, REGIÃO 43..1926; *Picea abies*) e (AF527416, REGIÃO: 78..1871; *Salvia stenophylla*).

### Geraniol

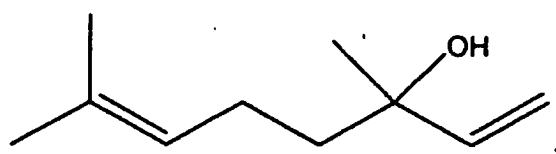
Geraniol (também conhecido como rhodnol), cuja estrutura é



é o componente principal de óleo de rosa e óleo de palmarosa. Ele também ocorre em gerânio, limão e citronela. Geraniol é fabricado de GPP pela geraniol sintase. Os exemplos ilustrativos de sequências de nucleotídeo adequadas incluem mas não são limitados a: (AJ457070; *Cinnamomum tenuipilum*), (AY362553; *Ocimum basilicum*), (DQ234300; *Perilla frutescens* cepa 1864), (DQ234299; *Perilla citriodora* cepa 1861), (DQ234298; *Perilla citriodora* cepa 4935) e (DQ088667; *Perilla citriodora*)

### Linalool

Linalool, cuja estrutura é

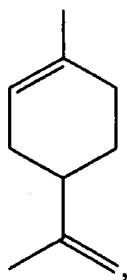


é encontrado em muitas flores e plantas de tempero tal como sementes coriander. Linalool é fabricado de GPP pela linalool sintase. Os exemplos ilustrativos de uma sequência de nucleotídeo adequada incluem mas não são limitados a: (AF497485; *Arabidopsis thaliana*), (AC002294, Local AAB71482; *Arabidopsis thaliana*), (AY059757; *Arabidopsis thaliana*), (NM\_104793; *Arabidopsis thaliana*), (AF154124; *Artemisia annua*), (AF067603; *Clarkia breweri*), (AF067602; *Clarkia concinna*), (AF067601; *Clarkia breweri*), (U58314; *Clarkia breweri*), (AY840091; *Lycopersicon esculentum*), (DQ263741; *Lavandula angustifolia*), (AY083653; *Mentha citrate*), (AY693647; *Ocimum basilicum*), (XM\_463918; *Oryza sativa*), (AP004078, Local BAD07605; *Oryza sativa*), (XM\_463918, Local XP\_463918; *Oryza sativa*), (AY917193; *Perilla citriodora*), (AF271259;

*Perilla frutescens*), (AY473623; *Picea abies*), (DQ195274; *Picea sitchensis*) e (AF444798; *Perilla frutescens* var. cultivar crispa N<sup>o</sup> 79).

### Limoneno

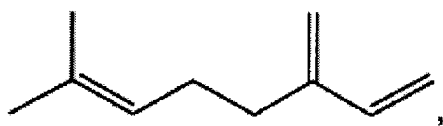
Limoneno, cuja estrutura é



5 é encontrado na casca de frutas cítricas e hortelã. Limoneno é fabricado a partir de GPP pela limoneno sintase. Os exemplos ilustrativos de sequências de nucleotídeo adequadas incluem mas não são limitados a: (+)-limoneno sintases (AF514287, REGIÃO: 47..1867; *Citrus limon*) e (AY055214, REGIÃO: 48..1889; *Agastache rugosa*) e (-)-limoneno sintases (DQ195275, 10 REGIÃO: 1..1905; *Picea sitchensis*), (AF006193, REGIÃO: 73..1986; *Abies grandis*) e (MI-IC4SLSP, REGIÃO: 29..1828; *Mentha spicata*).

### Mirceno

Mirceno, cuja estrutura é

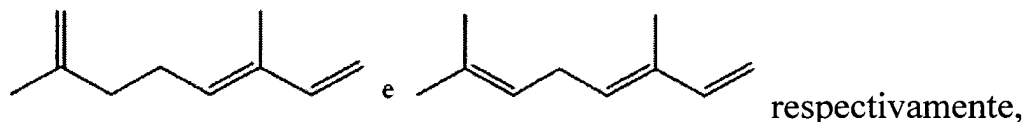


15 é encontrado no óleo essencial em muitas plantas incluindo louro, verbena e mircea da qual que ele tira o seu nome. Mirceno é fabricado a partir de GPP pela mirceno sintase. Os exemplos ilustrativos de sequências de nucleotídeo adequadas incluem mas não são limitados a: (U87908; *Abies grandis*), (AY195609; *Antirrhinum majus*), (AY195608; *Antirrhinum majus*), (NM\_127982; *Arabidopsis thaliana* TPS10), (NM\_113485; *Arabidopsis thaliana* ATTPS-CIN), (NM\_113483; *Arabidopsis thaliana* ATTPS-CIN), 20 (AF271259; *Perilla frutescens*), (AY473626; *Picea abies*), (AF369919; *Picea*

*abies*) e (AJ304839; *Quercus ilex*).

### Ocimeno

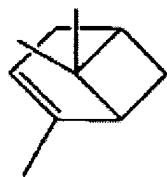
$\alpha$ - e  $\beta$ -Ocimeno, cujas estruturas são



são encontrados em uma variedade de plantas e frutas incluindo *Ocimum basilicum* e é fabricado a partir de GPP pela *ocimene sintase*. Os exemplos ilustrativos de sequências de nucleotídeo adequados incluem mas não são limitados a: (AY195607; *Antirrhinum majus*), (AY195609; *Antirrhinum majus*), (AY195608; *Antirrhinum majus*), (AK221024; *Arabidopsis thaliana*), (NM\_113485; *Arabidopsis thaliana* ATTPS-CIN), (NM\_113483; *Arabidopsis thaliana* ATTPS-CIN), (NM\_117775; *Arabidopsis thaliana* ATTPS03), (NM\_001036574; *Arabidopsis thaliana* ATTPS03), (NM\_127982; *Arabidopsis thaliana* TPS10), (AB 110642; *Citrus unshiu* CitMTSL4) e (AY575970; *Lotus corniculatus* var. *japonicus*).

### $\alpha$ -Pineno

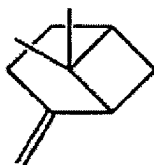
$\alpha$ -Pineno, cuja estrutura é



é encontrado nos pinheiros e eucalipto.  $\alpha$ -Pineno é fabricado a partir de GPP pela  $\alpha$ -pineno sintase. Os exemplos ilustrativos de sequências de nucleotídeo adequadas incluem mas não são limitados a: (+)  $\alpha$ -pineno sintase (AF543530, REGIÃO: 1..1887; *Pinus taeda*), (-) $\alpha$ -pineno sintase (AF543527, REGIÃO: 32..1921; *Pinus taeda*) e (+)/(-) $\alpha$ -pineno sintase (AGU87909, REGIÃO: 6111892; *Abies grandis*).

### $\beta$ -Pineno

$\beta$ -Pineno, cuja estrutura é

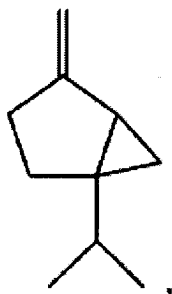


é encontrado em pinheiros, alecrim, salsa, endro, manjerição e rosa.  $\beta$ -Pineno é fabricado a partir de GPP pela  $\beta$ -pineno sintase. Os exemplos ilustrativos de sequências de nucleotídeo adequadas incluem mas não são limitados a: (-)  $\beta$ -pineno sintases (AF276072, REGIÃO: 1..1749; *Artemisia annua*) e

5 (AF514288, REGIÃO: 26..1834; *Citrus limon*).

### Sabineno

Sabineno, cuja estrutura é

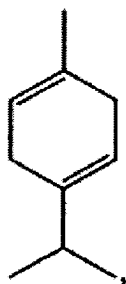


é encontrado na pimenta preta, semente de cenoura, sálvia e árvores de chá. Sabineno é fabricado a partir de GPP pela sabineno sintase. Um exemplo

10 ilustrativo de uma sequência de nucleotídeo adequada inclui mas não é limitado a AF051901, REGIÃO: 26..1798 de *Salvia officinalis*.

### $\gamma$ -Terpineno

$\gamma$ -Terpineno, cuja estrutura é

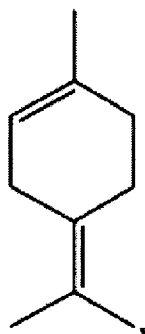


é um constituinte do óleo essencial de frutas cítricas. Bioquimicamente,  $\gamma$ -

terpineno é fabricado a partir de GPP por uma  $\gamma$ -terpineno sintase. Os exemplos ilustrativos de sequências de nucleotídeo adequadas incluem: (AF514286, REGIÃO: 30..1832 de *Citrus limon*) e (AB 110640, REGIÃO 1..1803 de *Citrus unshiu*).

## 5 Terpinoleno

Terpinoleno, cuja estrutura é



é encontrado na groselha preta, cipreste, goiaba, lichia, papaia, pinheiro e chá.

Terpinoleno é fabricado a partir de GPP pela terpinoleno sintase. Um exemplo ilustrativo de uma sequência de nucleotídeo adequada inclui mas não é limitado a AY906866, REGIÃO: 10..1887 de *Pseudotsuga menziesii*.

## Compostos C<sub>15</sub>

Os compostos C<sub>15</sub> fornecido aqui no geral derivam de farnesil pirofosfato (FPP) que é fabricado pela condensação de duas moléculas de IPP com uma molécula de DMAPP. Uma enzima conhecida por catalisar esta etapa é, por exemplo, a farnesil pirofosfato sintase. estes compostos C<sub>15</sub> também são conhecidos como sesquiterpenos porque são derivados de três unidades de isopreno.

A Figura 3 mostra esquematicamente como IPP e DMAPP podem ser combinados para produzir FPP, que podem ser ainda processados a um sesquiterpeno.

Os exemplos ilustrativos de sequências de nucleotídeo para a farnesil pirofosfato sintase incluem mas não são limitados a: (ATU80605; *Arabidopsis thaliana*), (ATHFPS2R; *Arabidopsis thaliana*), (AAU36376;

*Artemisia annua*), (AF461050; *Bos taurus*), (D00694; *Escherichia coli* K-12),  
 (AE009951, Local AAL95523; *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum*  
 ATCC 25586), (GFFPPSGEN; *Gibberella fujikuroi*), (CP000009, Local  
 AAW60034; *Gliconobacter oxidans* 62IH), (AF019892; *Helianthus annuus*),  
 5 (HUMFAPS; *Homo sapiens*), (KLPFPSQCR; *Kluyveromyces lactis*),  
 (LAU15777; *Lupinus albus*), (LAU20771; *Lupinus albus*), (AF309508; *Mus*  
*musculus*), (NCFPPSGEN; *Neurospora crassa*), (PAFPS1; *Parthenium*  
*argentatum*), (PAFPS2; *Parthenium argentatum*), (RATFAPS; *Rattus*  
*norvegicus*), (YSCFPP; *Saccharomyces cerevisiae*), (D89104;  
 10 *Schizosaccharomyces pombe*), (CP000003, Local AAT87386; *Streptococcus*  
*pyogenes*), (CP000017, Local AAZ51849; *Streptococcus pyogenes*),  
 (NC\_008022, Local YP\_598856; *Streptococcus pyogenes* MGAS 10270),  
 (NC\_008023, Local YP\_600845; *Streptococcus pyogenes* MGAS2096),  
 (NC\_008024, Local YP\_602832; *Streptococcus pyogenes* MGAS 10750) e  
 15 (MZEFPS; *Zea mays*).

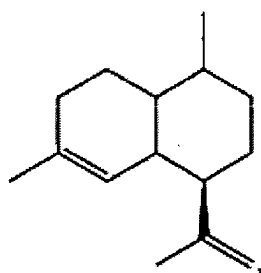
Alternativamente, FPP também pode ser fabricado pela adição  
 de IPP a GPP. Os exemplos ilustrativos de sequências de nucleotídeo que  
 codificam uma enzima capaz desta reação incluem mas não são limitados a:  
 (AE000657, Local AAC06913; *Aquifex aeolicus* VF5), (NM\_202836;  
 20 *Arabidopsis thaliana*), (D84432, Local BAA12575; *Bacillus subtilis*),  
 (U12678, Local AAC28894; *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110),  
 (BACFDPS; *Geobacillus stearothermophilus*), (NC\_002940, Local  
 NP\_873754; *Haemophilus ducreyi* 35000HP), (L42023, Local AAC23087;  
*Haemophilus influenzae* Rd KW20), (J05262; *Homo sapiens*), (YP\_395294;  
 25 *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 23K), (NC\_005823, Local Y13\_000273;  
*Leptospira interrogans* sorovar *Copenhageni* str. Fiocruz L 1 -130),  
 (AB003187; *Micrococcus luteus*), (NC\_002946, Local YP\_208768; *Neisseria*  
*gonorrhoeae* FA 1090), (U00090, Local AAB91752; *Rhizobium* sp.  
 NGR234), (J05091; *Saccharomyces cerevisiae*), (CP000031, Local

AAV93568; *Silicibacter pomeroyi* DSS-3), (AE008481, Local AAK99890; *Streptococcus pneumoniae* R6) e (NC\_004556, Local NP 779706; *Xilella fastidiosa* Temeculal).

5 FPP é depois subsequentemente convertido a uma variedade de compostos C<sub>15</sub>. Os exemplos ilustrativos de compostos C<sub>15</sub> incluem mas não são limitados a:

#### Amorfadieno

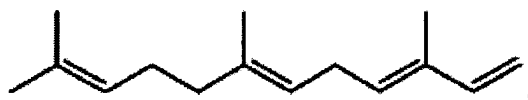
Amorfadieno, cuja estrutura é



10 é um precursor para a artemisinina que é fabricada pela *Artemisia anna*. Amorfadieno é fabricado a partir de FPP pela amorfadieno sintase. Um exemplo ilustrativo de uma sequência de nucleotídeo adequada é a SEQ ID NO. 37 da Patente U.S. Nº 7.192.751.

#### α-Farneseno

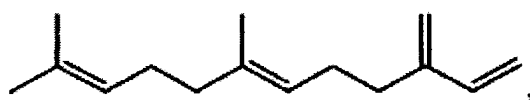
α-Farneseno, cuja estrutura é



15 é encontrado em várias fontes biológicas incluindo mas não limitado às glândulas de Dufour em formigas e no revestimento de cascas de maçã e pêra. α-Farneseno é fabricado a partir de FPP pela α-farneseno sintase. Os exemplos ilustrativos de sequências de nucleotídeo adequadas incluem mas não são limitadas a DQ309034 de *Pirus communis* cultivar d'Anjou (pêra; nome do gene AFS1) e AY182241 de *Malus domestica* (maçã; gene AFS1).  
20 Pechouus *et al.*. Planta 219(1): 84-94 (2004).

#### β-Farnesene

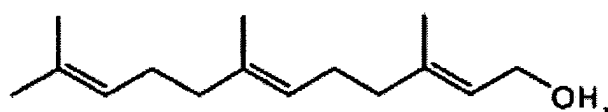
$\beta$ -Farneseno, cuja estrutura é



é encontrado em várias fontes biológicas incluindo mas não limitado a afídios e óleos essenciais tais como de hortelã. Em algumas plantas tais como batata selvagem,  $\beta$ -Farneseno é sintetizado como um repelente de inseto natural.  $\beta$ -Farneseno é fabricado a partir de FPP pela  $\beta$ -Farneseno sintase. Os exemplos ilustrativos de sequências de nucleotídeo adequadas incluem mas não são limitados ao número de acesso do GenBank AF024615 de *Mentha x piperita* (hortelã; gene Tspal 1) e AY835398 de *Artemisia annua*. Picaud *et al.*.. *Phytochemistry* 66(9): 961-967 (2005).

#### 10 Farnesol

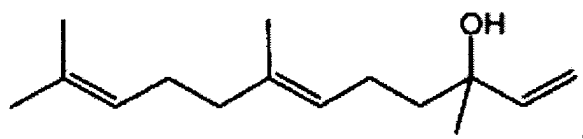
Farnesol, cuja estrutura é



é encontrado em várias fontes biológicas incluindo insetos e óleos essenciais tais como de citronela, néroli, cíclame, capim limão, angélica e rosa. Farnesol é fabricado a partir de FPP por uma hidroxilase tal como farnesol sintase. Os exemplos ilustrativos de sequências de nucleotídeo adequadas incluem mas não são limitados ao número de acesso ao GenBank AF529266 de *Zea mays* e YDR481C de *Saccharomyces cerevisiae* (gene Pho8). Song, L.. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 128: 149-158 (2006).

#### Nerolidol

20 Nerolidol, cuja estrutura é

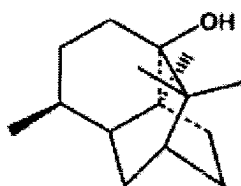


também é conhecido como peruvicol e é encontrado em várias fontes

biológicas incluindo como óleos essenciais tais como de néroli, gengibre, jasmin, lavanda, árvore de chá e capim limão. Nerolidol é fabricado a partir de FPP por uma hidroxilase tal como a nerolidol sintase. Um exemplo ilustrativo de uma sequência de nucleotídeo adequada inclui mas não é limitado a AF529266 de *Zea mays* (milho; gene *tpsl*).

#### Patchoulol

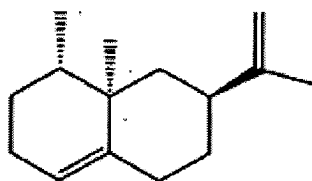
Patchoulol, cuja estrutura é



também é conhecido como álcool de patchouli e é um constituinte do óleo essencial de *Pogostemon patchouli*. Patchouliol é fabricado a partir de FPP pela patchouliol sintase. Um exemplo ilustrativo de uma sequência de nucleotídeo adequada inclui mas não é limitado a AY508730 REGIÃO: 1..1659 de *Pogostemon cablin*.

#### Valenceno

Valenceno, cuja estrutura é



é um dos principais componentes químicos do cheiro e aroma de laranjas e é encontrado em cascas de laranja. Valenceno é fabricado a partir de FPP pela nootkatone sintase. Exemplos ilustrativos de uma sequência de nucleotídeo adequada incluem mas não são limitados a AF441124 REGIÃO: 1..1647 de *Citrus sinensis* e AY917195 REGIÃO: 1..1653 de *Perilla frutescens*.

#### Compostos C20

Os compostos C20 aqui fornecidos no geral derivados de

pirofosfato de geranilgeraniol (GGPP) que é fabricado pela condensação de três moléculas de IPP com uma molécula de DMAPP. Uma enzima conhecida por catalisar esta etapa é, por exemplo, a geranilgeranil pirofosfato sintase. Estes compostos C<sub>20</sub> também são conhecidos como diterpenos porque eles são derivados de quatro unidades de isopreno.

A Figura 3 mostra esquematicamente como IPP e DMAPP podem ser combinados para produzir GGPP, que pode ser processado ainda a um diterpeno ou pode ser processado ainda para produzir um carotenóide.

Os exemplos ilustrativos de sequências de nucleotídeo para a geranilgeranil pirofosfato sintase incluem mas não são limitados a: (ATHGERPIRS; *Arabidopsis thaliana*), (BT005328; *Arabidopsis thaliana*), (NM\_119845; *Arabidopsis thaliana*), (NZ\_AAJM01000380, Local ZP\_00743052; *Bacillus thuringiensis* sorovar *israelensis*, ATCC 35646 sq1563), (CRGGPPS; *Catharanthus roseus*), (NZ\_AABF02000074, Local ZP\_00144509; *Fusobacterium nucleatum* subsp. *vincentii*, ATCC 49256), (GFGGPPSGN; *Gibberella fujikuroi*), (AY371321; *Ginkgo biloba*), (AB055496; *Hevea brasiliensis*), (AB017971; *Homo sapiens*), (MCI276129; *Mucor circinelloides* f. *lusitanicus*), (AB016044; *Mus musculus*), (AABX01000298, Local NCU01427; *Neurospora crassa*), (NCU20940; *Neurospora crassa*), (NZ\_AAKL01000008, Local ZP\_00943566; *Ralstonia solanacearum* UW551), (AB118238; *Rattus norvegicus*), (SCU31632; *Saccharomyces cerevisiae*), (AB016095; *Synechococcus elongates*), (SAGGPS; *Sinapis alba*), (SSOGDS; *Sulfolobus acidocaldarius*), (NC\_007759, Local YP\_461832; *Syntrophus aciditrophicus* SB) e (NC\_006840, Local YP\_204095; *Vibrio fischeri* ES 114).

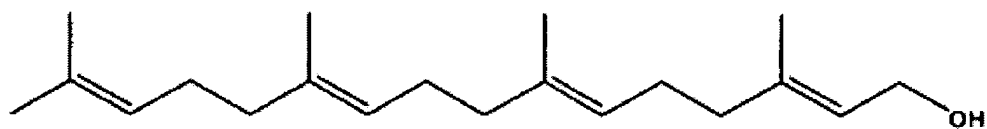
Alternativamente, GGPP também pode ser fabricado pela adição de IPP a FPP. Os exemplos ilustrativos de sequências de nucleotídeo que codificam uma enzima capaz desta reação incluem mas não são limitados a: (NM\_112315; *Arabidopsis thaliana*), (ERWCRTE; *Pantoea agglomerans*),

(D90087, Local BAA14124; *Pantoea ananatis*), (X52291, Local CAA36538; *Rhodobacter capsulatus*), (AF195122, Local AAF24294; *Rhodobacter sphaeroides*) e (NC\_004350, Local NP\_721015; *Streptococcus mutans* UA 159).

5 GGPP é depois subsequentemente convertido a uma variedade de isoprenóides  $C_{20}$ . Os exemplos ilustrativos de compostos  $C_{20}$  incluem mas não são limitados a:

#### Geranilgeraniol

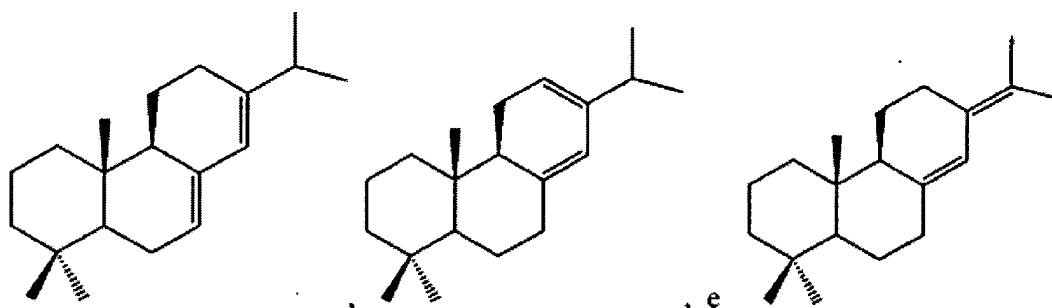
Geranilgeraniol, cuja estrutura é



10 é um constituinte de óleo de madeira de *Cedrela toona* e de óleo de linhaça. Geranylgeraniol pode ser fabricado por exemplo, adicionando-se às construções de expressão um gene da fosfatase depois o gene para uma GGPP sintase.

#### Abietadieno

15 Abietadieno abrange os seguintes isômeros:



e é encontrado em árvores tais como *Abies grandis*. Abietadieno é fabricado pela abietadieno sintase. Um exemplo ilustrativo de uma sequência de nucleotídeo adequada inclui mas não é limitado a: (U50768; *Abies grandis*) e (AY473621; *Picea abies*).

#### 20 Compostos $C_{20+}$

Os compostos  $C_{20+}$  também estão dentro do escopo aqui

fornecido. Os exemplos ilustrativos de tais compostos incluem sesterpenos (o composto  $C_{25}$  fabricado a partir de cinco unidades de isopreno), triterpenos (compostos  $C_{30}$  fabricado a partir de seis unidades de isopreno) e tetraterpenos (composto  $C_{40}$  fabricado a partir de oito unidades de isopreno). Estes compostos são fabricados pelo uso de métodos similares aqui descritos e substituindo ou adicionando sequências de nucleotídeo para a(s) sintase(s) apropriada(s).

#### Altos Rendimentos de Compostos Isoprenóides

São aqui fornecidos composições e métodos para uma produção robusta de isoprenóides cultivando-se ou mantendo-se as células hospedeiras sob condições em que etanol é usado como uma fonte de carbono. Usando os métodos aqui descritos, as células hospedeiras produzem mais do que cerca de 5 gramas de isoprenóide por litro de mistura de reação de fermentação (5 g/L). Em outras formas de realização, mais do que cerca de 10 g/L, mais do que cerca de 15 g/L, mais do que cerca de 20 g/L, mais do que 25 g/L são produzidos ou mais do que cerca de 30 g/L de isoprenóide são produzidos.

Alternativamente, a produção de isoprenóide pode ser expressada em termos de produtividade específica ao invés de rendimentos. Por exemplo, usando os métodos descritos aqui, as células hospedeiras produzem mais de cerca de 50 miligramas de isoprenóide por grama de células hospedeiras secas. Em outras formas de realização, mais do que cerca de 100 miligramas por grama de peso de célula seca, mais do que cerca de 150 miligramas por grama de peso de célula seca, mais do que cerca de 200 miligramas por grama de peso de célula seca, mais do que cerca de 250 miligramas por grama de peso de célula seca, mais do que cerca de 500 miligramas por grama de peso de célula seca, mais do que cerca de 750 miligramas por grama de peso de célula seca ou mais do que cerca de 1000 miligramas por grama de peso de célula seca de isoprenóide são produzidos.

Se o nível de produção é expressado em termos de rendimento ou produtividade específica, a produção ocorre em menos do que cerca de 120 horas, menos do que cerca de 96 horas, menos do que cerca de 72 horas, preferivelmente menos do que cerca de 48 horas ou ainda menos do que cerca de 24 horas.

Os métodos aqui fornecidos podem ser realizados em um processo de lote, um de lote alimentado ou um contínuo. Um processo de lote é tipicamente um processo fechado onde todas as matérias primas são adicionadas no começo do processo. Um processo de lote alimentado é tipicamente um processo fechado onde a fonte de carbono e/ou outros substratos são adicionados em incrementos por todo o processo. Um processo de lote alimentado permite o controle maior do meio e o crescimento dos microorganismos. Um processo contínuo pode ser considerado um sistema aberto onde o meio é continuamente adicionado e o produto é simultaneamente removido.

Processos entre os processos de lote alimentado e contínuo também podem ser usados. Por exemplo, em uma forma de realização, o processo é começado como um processo de lote alimentado e uma camada orgânica, é colocada em contato com o meio de cultivo enquanto o processo continua. Isoprenóides, que tipicamente têm uma solubilidade mais alta em uma solução orgânica do que em uma solução aquosa, são extraídos do meio na camada orgânica. Porque o produto é removido do meio, este método tem características tanto de um lote alimentado quanto de um processo contínuo.

A remoção de produto através de uma cobertura orgânica (por exemplo dodecano, miristato de isopropila, oleato de metila e outros) pode frequentemente levar a aumentos na produção de isoprenóide. A remoção de produto pode levar a aumentos de produção e é desejável particularmente onde o acúmulo de produto leva à inibição do caminho. Em certas formas de realização, a camada orgânica pode ser formada pelo próprio produto

isoprenóide. Isto ocorre onde o isoprenóide é produzido em excesso de seu ponto de saturação e forma uma camada separável a partir do meio aquoso.

Em algumas formas de realização, o etanol é a única fonte de carbono para as células hospedeiras. Em outras formas de realização, a fonte de carbono inclui uma fonte de carbono tanto de etanol quanto não etanol. Ainda em outras formas de realização, a fonte de carbono que não etanol é um carboidrato.

Os exemplos ilustrativos de carboidratos incluem monossacarídeos, dissacarídeos e combinações destes. Alguns exemplos não limitantes de monossacarídeos adequados incluem glicose, galactose, manose, frutose, ribose e combinações destes. Alguns exemplos não limitantes de dissacarídeos adequados incluem sacarose, lactose, maltose, trealose, celobiose e combinações destes. Alguns exemplos não limitantes de polissacarídeos adequados incluem amido, glicogênio, celulose, quitina e combinações destes. Outras fontes de carboidratos incluem caldo de cana e melaços.

No geral, os polissacarídeos são primeiro convertidos em monossacarídeos e oligossacarídeos por meios químicos ou pelos métodos enzimáticos antes que eles sejam usados como uma fonte de carbono para as células hospedeiras. Por exemplo, a celulose pode ser convertida em glicose pela enzima celulase. Em certas formas de realização, depois da decomposição do polissacarídeo, o monossacarídeo e/ou oligossacarídeo constitui pelo menos cerca de 50 % em peso da fonte de carbono como determinado no começo da fermentação. Em outras formas de realização, o monossacarídeo e/ou oligossacarídeo constitui pelo menos cerca de 80 % ou ainda 90 % em peso da fonte de carbono como determinado no começo da fermentação, tal que o meio de fermentação é essencialmente livre de celulose.

Em certas formas de realização, as células hospedeiras são

exogenamente fornecidas com etanol como uma fonte de carbono. Em outras formas de realização, o etanol que é consumido pelas células hospedeiras como a fonte de carbono foi fabricado pelas células hospedeiras. Em outras palavras, as células hospedeiras são fornecidas com uma fonte de carbono que não etanol (tipicamente um carboidrato) que é convertido pelas células hospedeiras em etanol e o etanol é subsequentemente consumido pelas células hospedeiras.

O uso pelas células hospedeiras de etanol pode ser quantificado de vários modos. Em um método, a concentração de etanol é usada. Além de ser uma fonte de carbono, a presença de etanol no meio também tem os efeitos benéficos de prevenir contaminantes microbianos.

Assim, em uma forma de realização, a concentração de etanol no meio é de pelo menos cerca de 1 grama por litro de meio por pelo menos 4 horas. A concentração de etanol pode ser determinada por qualquer método conhecido na técnica. A mesma pode ser medida diretamente pela amostragem do meio ou indiretamente pela amostragem do gás desprendido. Se um método indireto é usado tal como a análise do gás desprendido pelo espectrofotômetro de massa, uma correlação primeiro deve ser estabelecida entre as medições de gás desprendido em partes por milhão e as medições diretas de etanol no meio. Em outras formas de realização, a concentração de etanol no meio está entre cerca de 1 e cerca de 5 gramas, entre cerca de 1 e cerca de 10 gramas ou entre cerca de 1 e cerca de 20 gramas por litro de meio. Ainda em outras formas de realização, a concentração de etanol no meio é maior do que cerca de 10 gramas por litro de meio ou maior do que cerca de 20 gramas por litro de meio. Já em outras formas de realização, a concentração de etanol acima são mantidas por pelo menos 6 horas, 8 horas, 10 horas, 12 horas, 24 horas ou 48 horas.

Entretanto, as células hospedeiras podem ser usando etanol como uma fonte de carbono mas ainda ter níveis indetectáveis de etanol ou ter

concentração de etanol próxima a zero. Por exemplo, isto pode ocorrer quando as células hospedeiras estão consumindo etanol tão rápido quanto o etanol está sendo fornecido. Como um resultado, são aqui fornecidas medidas alternativas para a utilização de etanol pelas células hospedeiras.

5                   Em uma outra forma de realização, as células hospedeiras têm uma taxa de consumo de etanol específica de pelo menos 0,01 grama de etanol por grama de peso de célula seca por hora. Em outras formas de realização, a taxa de consumo de etanol específica está entre cerca de 0,01 e cerca de 0,20 grama de etanol ou entre cerca de 0,02 e cerca de 0,10 grama de etanol por grama de peso de célula seca por hora. Ainda em outras formas de realização, a taxa de consumo de etanol específica é maior do que cerca de 0,10 grama de etanol por grama de peso de célula seca por hora. A taxa de consumo de etanol específica é mantida por pelo menos 4 horas, 6 horas, 8 horas, 10 horas, 12 horas, 24 horas ou 48 horas.

15                   Alternativamente, a taxa de consumo de etanol específica é expressada em termos de gramas de etanol por grama de peso de célula seca por dia. Em algumas formas de realização, as células hospedeiras têm uma taxa de consumo de etanol específica de pelo menos 0,2 grama de etanol por grama de peso de célula seca por dia. Em algumas formas de realização, a taxa de consumo de etanol específica está entre cerca de 0,2 e cerca de 5 gramas ou entre cerca de 0,5 e cerca de 3 de etanol por grama de peso de célula seca por dia. Em outras formas de realização, a taxa de consumo de etanol específica é maior do que cerca de 3 gramas de etanol por grama de peso de célula seca por dia.

25                   Em certas formas de realização, as células são cultivadas ou mantidas sob condições que não são limitadas pelo oxigênio. Em outras palavras, as células estão sob condições aeróbicas.

Entretanto, manter as condições totalmente aeróbicas pode ser particularmente desafiador no processamento de oxigênio em grande escala

devido às limitações de transferência de massa e a solubilidade relativamente baixa do oxigênio em soluções aquosas. Por exemplo, se ar é usado para espargir dentro dos tanques, a solubilidade do oxigênio em água é de 9 miligramas por litro a 20° C. Se oxigênio puro é usado ao invés de ar, então a

5 solubilidade aumenta para 43 miligramas por litro. Em cada caso (espargir ar ou oxigênio puro), esta quantidade de oxigênio é esgotada em segundos por uma população microbiana ativa e concentrada a menos que oxigênio seja continuamente fornecido. Em comparação, as quantidades de outros nutrientes que são usados pelas células durante o mesmo período (segundos,  
10 por exemplo, menos do que um minuto) são negligenciáveis comparado com as concentrações volumosas.

Nós descobrimos que as células hospedeiras são aqui fornecidas capazes de tolerar algum período de limitação de oxigênio e e ainda fabricado altos níveis de compostos isoprenóides. Esta flexibilidade  
15 permite um processo mais econômico fornecendo-se economias em termos de projeto de tanque, demanda diminuída para gás oxigênio, custos de energia mais baixos para a aeração e outros. Além disso, sob certas circunstâncias, a limitação de oxigênio parece ser benéfica. Sem estar ligado pela teoria, o crescimento de célula sob condições limitadas em oxigênio parece possibilitar  
20 mais do carbono a ser direcionado ao produto ao invés de biomassa ou perda através do dióxido de carbono.

Como uma consequência, em certas outras formas de realização, as células hospedeiras são cultivadas ou mantidas sob condições que são limitadas em oxigênio. Os períodos de limitação de oxigênio incluem  
25 pelo menos 4 horas, pelo menos 6 horas, pelo menos 8 horas, pelo menos 10 horas, pelo menos 12 horas, pelo menos 24 horas ou pelo menos 48 horas.

A limitação de oxigênio ocorre quando a taxa de crescimento específica das células hospedeiras é menor do que a taxa de crescimento específico máxima onde o oxigênio não é limitante (por exemplo, fornecido

em excesso). A taxa de crescimento específica é a taxa de crescimento de células por unidade de biomassa por unidade de tempo e tem as unidades de tempo recíproco ( $1/t$ ). A taxa de crescimento específica máxima para as células em um meio de cultura diz respeito ao efeito de uma concentração de

5 substrato sobre a taxa de crescimento que neste caso é o oxigênio. No geral, as células crescerão lentamente em um nível baixo do substrato e conforme o nível do substrato no meio aumenta, assim o faz a taxa de crescimento de célula. Entretanto, a taxa de crescimento de célula não continua a se elevar indefinidamente e em níveis altos de substrato, um dado aumento na  
10 quantidade de substrato produzirá um aumento cada vez menor na taxa de crescimento de célula. Portanto, a taxa de crescimento por fim atinge um limite, que é frequentemente aludido como a taxa de crescimento específica máxima.

Um tratamento teórico da relação entre as taxas de crescimento  
15 em cultura é bem conhecido por aqueles habilitados na técnica e é aludido como a equação de Monod. Ver, por exemplo, Pirt, Principles of Microbe and Cell Cultivation, Wiley, NY, 1975, páginas 4-10. Neste tratamento teórico, a taxa específica máxima é um limite assintótico que nunca é atingido até que um nível infinito de substrato seja atingido. Na prática, entretanto, a rate de  
20 crescimento específica máxima pode ser considerada como sendo obtida quando as condições sob investigação (por exemplo, um nível de substrato tal como oxigênio) sustentam a taxa de crescimento inicial mais rápida. Por exemplo, em um reator de lote alimentado, a condição inicial onde todos os substratos requeridos para o crescimento (por exemplo nutrientes e oxigênio)  
25 são fornecidos em excesso, e a fermentação ocorre na temperatura ótima para a célula hospedeira é tratada como as condições para a taxa de crescimento máxima. Ver, por exemplo, Lee *et al.* (1996) Trends Biotechnol. 14: 98-105 e Korz *et al.* (1995) J Biotechnology 39: 59-65. A taxa de crescimento específica máxima também é algumas vezes aludida como crescimento

ilimitado.

Em um método, a limitação de oxigênio é quantificada pela concentração de oxigênio no meio e é expressada em termos de concentração de oxigênio dissolvido (DOC). A DOC no meio de cultura pode ser menor do que cerca de 20 %, menos do que cerca de 15 %, menos do que cerca de 10 % e menos do que cerca de 5 %. Em outras formas de realização a DOC é de cerca de 0 % ou abaixo do nível de detecção.

Entretanto, porque o oxigênio é consumido pelas células de modo relativamente rápido, uma DOC de zero pode significar que as células estão sendo cultivadas sob condições anaeróbicas (nenhum oxigênio) ou que as células estão consumindo oxigênio tão rápido quanto está sendo fornecido. Em um outro método, o uso de oxigênio pelas células é expressado em termos de taxa de captação de oxigênio (OUR; a taxa de consumo de oxigênio pelas células por litro de meio) para diferenciar entre estas duas possibilidades. As taxas de captação de oxigênio adequadas incluem menos do que cerca de 50 mmoles, menos do que cerca de 40 mmoles, menos do que cerca de 30 mmoles, menos do que cerca de 20 mmoles por litro de meio ou menos do que cerca de 10 mmoles por litro de meio.

Alternativamente, a taxa de captação de oxigênio específica (SOUR que é OUR dividido pela densidade de célula) pode ser usada quando valores normalizados com respeito às densidades de célula são preferidos. A quantidade de microorganismo por litro de fermentação ou a densidade de microorganismo, podem ser medidas medindo-se o peso de microorganismo isolado a partir de um dado volume do meio de fermentação. Uma medida comum é o peso seco das células por litro de meio de fermentação. Um outro método que pode ser usado para monitorar a fermentação enquanto está progredindo é por uma medição da densidade ótica do meio. Um método comum é medir a densidade ótica em um comprimento de onda de 600 nm, aludido à  $OD_D$  ou à OD. A OD pode estar correlacionada com uma densidade

de um tipo específico de organismo dentro de um meio específico, mas as relações específicas entre OD e a quantidade de microorganismo por volume no geral não será aplicável através de todos os tipos de organismos em todos os tipos de meio. Uma curva de calibração pode ser criada medindo-se a OD e

5 o peso de célula seca em uma faixa de densidades de célula. Em alguns casos, estas correlações podem ser usadas em fermentação diferente do mesmo ou microorganismos similares no mesmo ou meios similares. As taxas de captação de oxigênio específicas adequadas incluem menos do que cerca de 30 mmoles, menos do que cerca de 25 mmoles, menos do que cerca de 20  
10 mmoles, menos do que cerca de 15 mmoles, menos do que cerca de 10 mmoles ou menos do que cerca de 5 mmoles por grama de peso de célula seca por hora.

Nós também descobrimos que as células hospedeiras são aqui fornecidas capazes de tolerar algum período de limitação de fosfato e ainda  
15 fabricar altos níveis de compostos isoprenóides. Sem estar ligado pela teoria, o crescimento de célula sob condições limitadas em fosfato parece possibilitar que mais do carbono seja direcionado para o produto ao invés da biomassa. As concentrações adequadas de fosfato no meio são menores do que cerca de 5 gramas, menores do que cerca de 4 gramas, menores do que cerca de 3  
20 gramas, menores do que cerca de 2 gramas ou menores do que cerca de 1 grama por litro de meio. Em certas formas de realização, a concentração de fosfato é zero ou abaixo do nível de detecção. Os períodos de tal limitação de fosfato incluem pelo menos 4 horas, pelo menos 6 horas, pelo menos 8 horas, pelo menos 10 horas, pelo menos 12 horas, pelo menos 24 horas ou pelo  
25 menos 48 horas.

As células hospedeiras podem ser cultivadas sob condições não limitantes (que permitam o crescimento específico máximo) para formar biomassa suficiente antes que as condições limitantes (limitada em oxigênio, limitadas em fosfato ou ambas) sejam impostas. Estas condições limitantes

incluem aquelas tal que o crescimento específico é menor do que cerca de 90 %, 80 %, 75 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 25 %, 20 %, 10 %, 5 % ou 1 %, da taxa de crescimento específica máxima.

Embora formas de realização específicas sejam aqui fornecidas, a descrição precedente é intencionada a ilustrar e não limitar o escopo das formas de realização. Outros aspectos, vantagens e modificações dentro do escopo das formas de realização estarão evidentes àqueles habilitados na técnica.

### EXEMPLOS

A menos que de outro modo indicado; as técnicas convencionais da indústria biossintética e outras, que estão dentro da habilidade da técnica, podem ser usadas para praticar as formas de realização aqui fornecidas. Até o grau em que tais técnicas não são descritas aqui totalmente, pode-se encontrar referência ampla para elas na literatura científica.

Nos exemplos seguintes, esforços foram feitos para garantir a precisão com respeito aos números usados (por exemplo, quantidades, temperatura e assim por diante), mas variação e desvio podem ser acomodados e no evento de um erro de escrita nos números relatados aqui existir, uma pessoa de habilidade comum na técnica pode deduzir a quantidade correta em vista da divulgação remanescente aqui. A menos que de outro modo indicado, a temperatura é relatada em graus Celsius e a pressão está na ou próximo da pressão atmosférica ao nível do mar. Todos os reagentes, a menos que de outro modo indicado, foram obtidos comercialmente. Os seguintes exemplos são intencionados apenas para propósitos ilustrativos e não limitam em nenhuma modo o escopo das formas de realização aqui fornecidas.

#### Exemplo 1

Este exemplo descreve métodos para fabricar vetores para a

integração alvejada de ácidos nucleicos que codificam enzimas incluindo enzimas do caminho MEV em localizações cromossômicas específicas de *Saccharomyces cerevisiae*.

O DNA genômico foi isolado a partir de cepas Y002 e Y003

5 de *Saccharomyces cerevisiae* (CEN.PK2 fundo MATA ou MATa ura3-52 trp1-289 leu2-3,112 his3A1 MAL2-8C SUC2) (van Dijken *et al.* (2000) Enzyme Microb. Technol. 26: 706-714), Y007 (S288C fundo MATA trp1A63) (número ATCC 200873) e EG123 (MATA ura3 trp1 leu2 his4 can1) (Michaelis & Herskowitz. (1988) Mol. Cell. Biol. 8: 1309-1318). As cepas  
10 foram cultivadas durante a noite em meio líquido contendo 1 % de extrato de Levedura, 2 % de Bacto-peptona e 2 % de Dextrose (meio YPD). As células foram isoladas a partir de culturas líquidas de 10 ml pela centrifugação a 3.100 rpm, lavagem das pelotas de célula em 10 ml de água ultra-pura e re-centrifugação. O DNA genômico foi extraído usando o kit de extração de  
15 DNA de levedura Y-DER (Pierce Biotechnologies, Rockford, IL) como pelo protocolo sugerido pelo fabricante. O DNA genômico extraído foi recolocado em suspensão em 100 µl de Tris-Cl 10 mM, pH 8,5 e leituras na OD<sub>260/280</sub> foram tomadas em um espectrofotômetro ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) para determinar a concentração e pureza do DNA  
20 genômico.

A amplificação de DNA pela Reação da cadeia da polimerase (PCR) foi feita em um Applied Biosystems 2720 Thermociclador (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA) usando o sistema Phusion High Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes OY, Espoo, Finlândia) como pelo protocolo  
25 sugerido pelo fabricante. Na conclusão de uma amplificação pela PCR de um fragmento de DNA que foi para ser inserido no vetor de clonagem TOPO TA pCR2.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Uma projeção de nucleotídeo foi criada pela adição de 1 µl de Qiagen Taq Polimerase (Qiagen, Valencia, CA) para a mistura de reação e realizando uma etapa de extensão pela PCR de 10

minutos adicionais, 72° C, seguida pelo esfriamento a 4° C. Na conclusão de uma amplificação pela PCR, 8 µl de uma solução de glicerol a 50 % foram adicionados à mistura de reação.

A eletroforese em gel de agarose foi realizada usando um gel de agarose a 1 % de TBE (0,89 M de Tris, 0,89 M de ácido bórico, 0,02 M de sal de sódio de EDTA) contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídio, a 120 V, 400 mA por 30 minutos. As faixas de DNA foram visualizadas usando luz ultravioleta. As faixas de DNA foram excisadas do gel com uma lâmina de barbear estéril e o DNA excisado foi purificado em gel usando o kit Zymoclean Gel DNA Recovery (Zymo Research, Orange, CA) de acordo com os protocolos sugeridos pelo fabricante. O DNA purificado foi eluído em 10 µl de água ultra-pura e as leituras na OD<sub>260/280</sub> foram tomadas em um espectrofotômetro ND-1000 para determinar a concentração e pureza do DNA.

As ligações foram realizadas usando 100 a 500 µg de produto de PCR purificado e T4 DNA Ligase de Alta Concentração (New England Biolabs, Ipswich, MA) como pelo protocolo sugerido pelo fabricante. Para a propagação de plasmídeo, as construções ligadas foram transformadas em células DH5cc da *Escherichia coli* quimicamente competentes (Invitrogen, Carlsbad, CA) como pelo protocolo sugerido pelo fabricante. Os transformantes positivos foram selecionados no meio sólido contendo 1,5 % de Bacto Agar, 1 % de Triptona, 0,5 % de Extrato de Levedura, 1 % de NaCl e um antibiótico apropriado. Os transformantes isolados foram cultivados por 16 horas em meio de Luria-Bertoni (LB) líquido contendo antibióticos apropriados a 37° C e o plasmídeo foi isolado e purificado usando um kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen, Valencia, CA) como pelo protocolo sugerido pelo fabricante. As construções foram verificadas realizando-se as digestões de enzima de restrição de diagnóstico, resolvendo fragmentos de DNA em um gel de agarose e visualizando as faixas usando luz ultravioleta.

As construções selecionadas também foram verificadas pelo sequenciamento de DNA, que foi feito pela Elim Biopharmaceuticals Inc. (Hayward, CA).

O plasmídeo pAM489 foi gerado inserindo-se o inserto ERG20-P<sub>GAL</sub>-tHMGR do vetor pAM471 no vetor pAM466. O vetor pAM471

5 foi gerado inserindo-se o fragmento de DNA ERG20-P<sub>GAL</sub>-tHMGR, que compreende a matriz de leitura aberta (ORF) do gene ERG20 de *Saccharomyces cerevisiae* (posições de nucleotídeo de ERG20 de 1 a 1208; A do códon de início ATG é o nucleotídeo 1) (ERG20), o local genômico contendo o promotor GAL1 e GAL10 divergente de *Saccharomyces*  
10 *cerevisiae* (posição de nucleotídeo de GAL1 -1 a -668) (P<sub>GAL</sub>) e uma ORF truncada do gene HMGI de *Saccharomyces cerevisiae* (posições de nucleotídeo de HMGI de 1586 a 3323) (tHMGR), no vetor de clonagem TOPO Zero Blunt II (Invitrogen, Carlsbad, CA). O vetor pAM466 foi gerado inserindo-se o fragmento de DNA TRP1<sup>-856 a +548</sup>, que compreende um  
15 segmento do local TRP1 do tipo selvagem de *Saccharomyces cerevisiae* que se estende da posição de nucleotídeo -856 até a posição 548 e abriga um sítio de restrição *XmaI* interno não nativo entre as bases -226 e -225, no vetor de clonagem TOPO TA pCR2.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Os fragmentos de DNA ERG20-P<sub>GAL</sub>-tHMGR e TRP1<sup>-856 a +548</sup> foram gerados pela amplificação  
20 pela PCR como resumido na Tabela 1. Para a construção de pAM489, 400 ng de pAM471 e 100 ng de pAM466 foram digeridos até a conclusão usando enzima de restrição *XmaI* (New England Biolabs, Ipswich, MA), os fragmentos de DNA que correspondem ao inserto ERG20-P<sub>GAL</sub>-tHMGR e o vetor pAM466 linearizado foram purificados em gel e 4 equivalentes molares  
25 do inserto purificado foi ligado com 1 equivalente molar do vetor linearizado purificado, produzindo pAM489. A Figura 4A mostra um mapa do inserto ERG20-P<sub>GAL</sub>-tHMGR e a SEQ ID NO: 1 mostra a sequência de nucleotídeo do inserto com sequências TRP1 flangeadoras.

Tabela 1 – Amplificações de PCR realizadas para gerar pAM489

| Rodada de PCR | Padrão                                                                                                         | Iniciador 1                       | Iniciador 2                       | Produto de PCR                |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| 1             | 100 ng de DNA genômico Y003                                                                                    | 61-67-CPK001-G<br>(SEQ ID NO: 12) | 61-67-CPK002-G<br>(SEQ ID NO: 13) | TRP1 <sup>-856 a -226</sup>   |
|               |                                                                                                                | 61-67-CPK003-G<br>(SEQ ID NO: 14) | 61-67-CPK004-G<br>(SEQ ID NO: 15) | TRP1 <sup>-225 a +548</sup>   |
|               | 100 ng de DNA genômico EG123                                                                                   | 61-67-CPK025-G<br>(SEQ ID NO: 36) | 61-67-CPK050-G<br>(SEQ ID NO: 44) | ERG20                         |
|               |                                                                                                                | 61-67-CPK051-G<br>(SEQ ID NO: 45) | 61-67-CPK052-G<br>(SEQ ID NO: 46) | P <sub>GAL</sub>              |
|               | 100 ng de DNA genômico Y002                                                                                    | 61-67-CPK053-G<br>(SEQ ID NO: 47) | 61-67-CPK031-G<br>(SEQ ID NO: 37) | tHMGR                         |
|               |                                                                                                                |                                   |                                   |                               |
| 2             | 100 ng de cada um dos produtos de PCR purificados de TRP1 <sup>-856 a -226</sup> e TRP1 <sup>-225 a +548</sup> | 61-67-CPK001-G<br>(SEQ ID NO: 12) | 61-67-CPK004-G<br>(SEQ ID NO: 15) | TRP1 <sup>-856 a +548</sup>   |
|               | 100 ng de cada um dos produtos de PCR purificados de ERG20 e P <sub>GAL</sub>                                  | 61-67-CPK025-G<br>(SEQ ID NO: 36) | 61-67-CPK052-G<br>(SEQ ID NO: 46) | ERG20-P <sub>GAL</sub>        |
| 3             | 100 ng cada de cada um dos produtos de PCR purificados de ERG20-P <sub>GAL</sub> e tHMGR                       | 61-67-CPK025-G<br>(SEQ ID NO: 36) | 61-67-CPK031-G<br>(SEQ ID NO: 37) | ERG20-P <sub>GAL</sub> -tHMGR |

O plasmídeo pAM491 foi gerado inserindo-se o inserto ERG13-P<sub>GAL</sub>-tHMGR do vetor pAM472 no vetor pAM467. O vetor pAM472 foi gerado inserindo-se fragmento de DNA ERG13-P<sub>GAL</sub>-tHMGR, que compreende a ORF do gene ERG13 de *Saccharomyces cerevisiae* (posições de nucleotídeo de ERG13 de 1 a 1626) (ERG13), o local genômico contendo o promotor divergente GAL1 e GAL10 de *Saccharomyces cerevisiae* (posição de nucleotídeo de GAL1 de -1 a -668) (Pam.) e uma ORF truncada do gene HMG1 de *Saccharomyces cerevisiae* (posição de nucleotídeo de HMG1 de 1586 a 3323) (tHMGR), no vetor de clonagem TOPO Zero Blunt II. O vetor pAM467 foi gerado inserindo-se fragmento de DNA URA3<sup>-723 a 701</sup>, que compreende um segmento do local URA3 do tipo selvagem de *Saccharomyces cerevisiae* que se estende da posição de nucleotídeo -723 até a posição -224 e abriga um sítio de restrição *XmaI* interno não nativo entre as bases -224 e -223, no vetor de clonagem TOPO TA pCR2.1. Os fragmentos de DNA ERG13-P<sub>GAL</sub>-tHMGR e URA3<sup>-723 a 701</sup> foram gerados pela amplificação pela PCR como resumido na Tabela 2. Para a construção de pAM491, 400 ng de pAM472 e 100 ng de pAM467 foram digeridos até a

conclusão usando a enzima de restrição *XmaI*, os fragmentos de DNA que correspondem ao inserto ERG13-P<sub>GAL</sub>-tHMGR e o vetor pAM467 linearizados foram purificados em gel e 4 equivalentes molares do inserto purificado foi ligado com 1 equivalente molar do vetor linearizado purificado, produzindo pAM491. A Figura 4B mostra um mapa do inserto ERG13-P<sub>GAL</sub>-tHMGR e a SEQ ID NO: 2 mostra a sequência de nucleotídeo do inserto com sequências URA3 flanqueadoras.

**Tabela 2 – Amplificações pela PCR realizadas para gerar pAM491**

| Rodada de PCR | Padrão                                                                                                     | Iniciador 1                       | Iniciador 2                       | Produto da PCR                |
|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| 1             | 100 ng de DNA genômico Y007                                                                                | 61-67-CPK005-G<br>(SEQ ID NO: 16) | 61-67-CPK006-G<br>(SEQ ID NO: 17) | URA3 <sup>-723 a -224</sup>   |
|               |                                                                                                            | 61-67-CPK007-G<br>(SEQ ID NO: 18) | 61-67-CPK008-G<br>(SEQ ID NO: 19) | URA3 <sup>-223 a 701</sup>    |
|               | 100 ng de DNA genômico Y002                                                                                | 61-67-CPK032-G<br>(SEQ ID NO: 38) | 61-67-CPK054-G<br>(SEQ ID NO: 48) | ERG13                         |
|               |                                                                                                            | 61-67-CPK052-G<br>(SEQ ID NO: 46) | 61-67-CPK055-G<br>(SEQ ID NO: 49) | P <sub>GAL</sub>              |
|               |                                                                                                            | 61-67-CPK031-G<br>(SEQ ID NO: 37) | 61-67-CPK053-G<br>(SEQ ID NO: 47) | tHMGR                         |
| 2             | 100 ng de cada um dos produtos de PCR purificados URA3 <sup>-723 a -224</sup> e URA3 <sup>-223 a 701</sup> | 61-67-CPK005-G<br>(SEQ ID NO: 16) | 61-67-CPK008-G<br>(SEQ ID NO: 19) | URA3 <sup>-723 a 701</sup>    |
|               | 100 ng de cada um dos produtos de PCR purificados de ERG13 e P <sub>GAL</sub>                              | 61-67-CPK032-G<br>(SEQ ID NO: 38) | 61-67-CPK052-G<br>(SEQ ID NO: 46) | ERG13-P <sub>GAL</sub>        |
| 3             | 100 ng de cada um dos produtos de PCR purificados ERG13-P <sub>GAL</sub> e tHMGR                           | 61-67-CPK031-G<br>(SEQ ID NO: 37) | 61-67-CPK032-G<br>(SEQ ID NO: 38) | ERG13-P <sub>GAL</sub> -tHMGR |

O plasmídeo pAM493 foi gerado inserindo-se o inserto IDI1-P<sub>GAL</sub>-tHMGR do vetor pAM473 no vetor pAM468. O vetor pAM473 foi gerado inserindo-se o fragmento de DNA IDI1-P<sub>GAL</sub>-tHMGR, que compreende a ORF do gene IDI1 de *Saccharomyces cerevisiae* (posição de nucleotídeo de IDI1 de 1 a 1017) (IDI1), o local genômico contendo o promotor GAL1 e GAL10 divergente de *Saccharomyces cerevisiae* (posição de nucleotídeo de GAL1 de -1 a -668) (P<sub>GAL</sub>) e uma ORF truncada do gene HMG1 de *Saccharomyces cerevisiae* (posições de nucleotídeo de HMG1 de

1586 a 3323) (tHMGR), no vetor de clonagem TOPO Zero Blunt II. O vetor pAM468 foi gerado inserindo-se o fragmento de DNA ADE1<sup>-825 a 653</sup>, que compreende um segmento do local ADE1 do tipo selvagem de *Saccharomyces cerevisiae* que se estende a partir da posição de nucleotídeo -225 até a posição 653 e abriga um sítio de restrição *XmaI* interno não nativo entre as bases -226 e -225, no vetor de clonagem TOPO TA pCR2.1. Os fragmentos de DNA IDI1-P<sub>GAL</sub>-tHMGR e ADE1<sup>-825 a 653</sup> foram gerados pela amplificação pela PCR como resumido na Tabela 3. Para a construção de pAM493, 400 ng de pAM473 e 100 ng de pAM468 foram digeridos até a conclusão usando enzima de restrição *XmaI*, os fragmentos de DNA que correspondem ao inserto IDI1-P<sub>GAL</sub>-tHMGR e o vetor pAM468 linearizado foram purificados em gel e 4 equivalentes molares do inserto purificado foi ligado com 1 equivalente molar do vetor linearizado purificado, produzindo o vetor pAM493. A Figura 4C mostra um mapa do inserto IDI1-P<sub>GAL</sub>-tHMGR e a SEQ ID NO: 3 mostra a sequência de nucleotídeo do inserto com sequências ADE1 flanqueadoras.

Tabela 3 – Amplificações pela PCR realizadas para gerar pAM493

| Rodada de PCR | Padrão                                                                                                     | Iniciador 1                    | Iniciador 2                    | Produto da PCR               |
|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| 1             | 100 ng de DNA genômico Y007                                                                                | 61-67-CPK009-G (SEQ ID NO: 20) | 61-67-CPK010-G (SEQ ID NO: 21) | ADE1 <sup>-825 a -226</sup>  |
|               |                                                                                                            | 61-67-CPK011-G (SEQ ID NO: 22) | 61-67-CPK012-G (SEQ ID NO: 23) | ADE1 <sup>-225 a 653</sup>   |
|               | 100 ng de DNA genômico Y002                                                                                | 61-67-CPK047-G (SEQ ID NO: 43) | 61-67-CPK064-G (SEQ ID NO: 58) | IDI1                         |
|               |                                                                                                            | 61-67-CPK052-G (SEQ ID NO: 46) | 61-67-CPK065-G (SEQ ID NO: 59) | P <sub>GAL</sub>             |
|               |                                                                                                            | 61-67-CPK031-G (SEQ ID NO: 37) | 61-67-CPK053-G (SEQ ID NO: 47) | tHMGR                        |
| 2             | 100 ng de cada um dos produtos da PCR purificados ADE1 <sup>-825 a -226</sup> e ADE1 <sup>-225 a 653</sup> | 61-67-CPK009-G (SEQ ID NO: 20) | 61-67-CPK012-G (SEQ ID NO: 23) | ADE1 <sup>-825 a 653</sup>   |
|               | 100 ng de cada um dos produtos da PCR purificados IDI1 e P <sub>GAL</sub>                                  | 61-67-CPK047-G (SEQ ID NO: 43) | 61-67-CPK052-G (SEQ ID NO: 46) | IDI1-P <sub>GAL</sub>        |
| 3             | 100 ng de cada um dos produtos da PCR purificados IDI1-P <sub>GAL</sub> e tHMGR                            | 61-67-CPK031-G (SEQ ID NO: 37) | 61-67-CPK047-G (SEQ ID NO: 43) | IDI1-P <sub>GAL</sub> -tHMGR |

O plasmídeo pAM495 foi gerado inserindo-se o inserto

ERG10-P<sub>GAL</sub>-ERG12 de pAM474 no vetor pAM469. O vetor pAM474 foi gerado inserindo-se o fragmento de DNA ERG10-P<sub>GAL</sub>-ERG12, que compreende a ORF do gene ERG 10 de *Saccharomyces cerevisiae* (posição de nucleotídeo de ERG 10 de 1 a 1347) (ERG10), o local genômico contendo

5 os promotores GAL1 e GAL10 divergentes de *Saccharomyces cerevisiae* (posição de nucleotídeo de GAL1 de -1 a -668) (P<sub>GAL</sub>) e a ORF do gene ERG12 de *Saccharomyces cerevisiae* (posição de nucleotídeo de ERG 12 de 1 a 1482) (ERG 12), no vetor de clonagem TOPO Zero Blunt II. O vetor pAM469 foi gerado inserindo-se o fragmento de DNA HIS3<sup>-32 a 1000</sup> a  
 10 HISMX-HIS3<sup>504 a -1103</sup>, que compreende dois segmentos do local HIS de *Saccharomyces cerevisiae* que se estende da posição de nucleotídeo de -32 até a posição -1000 e da posição de nucleotídeo de 504 até a posição 1103, um marcador HISMX e um sítio de restrição *XmaI* não nativo entre a sequência HIS3<sup>504 a -1103</sup> e o marcador HISMX, no vetor de clonagem TOPO TA pCR2.1.  
 15 Os fragmentos de DNA ERG10-P<sub>GAL</sub>-ERG12 e HIS3<sup>-32 a 1000</sup>-HISMX- HIS3<sup>504 a -1103</sup> foram gerados pela amplificação pela PCR como resumido na Tabela 4. Para a construção de pAM495, 400 ng de pAM474 e 100 ng de pAM469 foram digeridos até a conclusão usando enzima de restrição *XmaI*, os fragmentos de DNA que correspondem ao inserto de ERG10-P<sub>GAL</sub>-ERG12 e o  
 20 vetor pAM469 linearizado foram purificados em gel e 4 equivalentes molares do inserto purificado foram ligados com 1 equivalente molar do vetor linearizado purificado, produzindo o vetor pAM495. A Figura 4D mostra um mapa do inserto ERG10-P<sub>GAL</sub>-ERG12 e a SEQ ID NO: 4 mostra a sequência de nucleotídeo do inserto com sequências HIS3 flanqueadoras.

Tabela 4 – Reações de PCR realizadas para gerar pAM495

| Rodada de PCR | Padrão                                                                                                               | Iniciador 1                          | Iniciador 2                          | Produto de PCR                                                    |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| 1             | 100 ng of Y007 genômica DNA                                                                                          | 61-67-CPK013-G<br>(SEQ ID NO: 24)    | 61-67-CPK014alt-G<br>(SEQ ID NO: 25) | His3 <sup>-32 a -1000</sup>                                       |
|               |                                                                                                                      | 61-67-CPK017-G<br>(SEQ ID NO: 28)    | 61-67-CPK018-G<br>(SEQ ID NO: 29)    | HIS3 <sup>504 a -1103</sup>                                       |
|               |                                                                                                                      | 61-67-CPK035-G<br>(SEQ ID NO: 39)    | 61-67-CPK056-G<br>(SEQ ID NO: 50)    | ERG10                                                             |
|               |                                                                                                                      | 61-67-CPK057-G<br>(SEQ ID NO: 51)    | 61-67-CPK058-G<br>(SEQ ID NO: 52)    | P <sub>GAL</sub>                                                  |
|               | 10 ng de DNA pAM330 plasmidico**                                                                                     | 61-67-CPK040-G<br>(SEQ ID NO: 40)    | 61-67-CPK059-G<br>(SEQ ID NO: 53)    | ERG12                                                             |
|               |                                                                                                                      | 61-67-CPK015alt-G<br>(SEQ ID NO: 26) | 61-67-CPK016-G<br>(SEQ ID NO: 27)    | HISMX                                                             |
| 2             | 100 ng de cada um dos produtos de PCR purificados de HIS3 <sup>504 a -1103</sup> e HISMX                             | 61-67-CPK015alt-G<br>(SEQ ID NO: 26) | 61-67-CPK018-G<br>(SEQ ID NO: 29)    | HISMX-HIS3 <sup>504 a -1103</sup>                                 |
|               | 100 ng de cada um dos produtos de PCR purificados de ERG10 e P <sub>GAL</sub>                                        | 61-67-CPK035-G<br>(SEQ ID NO: 39)    | 61-67-CPK058-G<br>(SEQ ID NO: 52)    | ERG10-P <sub>GAL</sub>                                            |
| 3             | 100 ng de cada um dos produtos de PCR purificados de HIS3 <sup>-32 a -1000</sup> e HISMX-HIS3 <sup>504 a -1103</sup> | 61-67-CPK013-G<br>(SEQ ID NO: 24)    | 61-67-CPK018-G<br>(SEQ ID NO: 29)    | HIS3 <sup>-32 a -1000</sup><br>HISMX- HIS3 <sup>504 a -1103</sup> |
|               | 100 ng de cada um dos produtos de PCR purificados de ERG10- P <sub>GAL</sub> e ERG12                                 | 61-67-CPK035-G<br>(SEQ ID NO: 39)    | 61-67-CPK040-G<br>(SEQ ID NO: 40)    | ERG10-P <sub>GAL</sub> -<br>ERG12                                 |

\*\* O marcador HISMX em pAM330 originou-se de pFA6a-HISMX6-P<sub>GAL</sub>1 como descrito por van Dijken *et al.* ((2000) *Enzima Microb. Technol.* 26(9-10): 706-714).

O plasmídeo pAM497 foi gerado inserindo-se o inserto ERG8-P<sub>GAL</sub>-ERG19 de pAM475 no vetor pAM470. O vetor pAM475 foi gerado inserindo-se o fragmento de DNA ERG8-P<sub>GAL</sub>-ERG19, que compreende a

5. ORF do gene ERG8 de *Saccharomyces cerevisiae* (ERG8 posição de nucleotídeo de 1 a 1512) (ERG8), o local genômico contendo os promotores GAL1 e GAL10 divergentes de *Saccharomyces cerevisiae* (GAL1 posição de nucleotídeo de -1 a -668) (P<sub>GAL</sub>) e a ORF do gene ERG19 de *Saccharomyces cerevisiae* (ERG19 posição de nucleotídeo de 1 a 1341) (ERG 19), no vetor

10 de clonagem TOPO Zero Blunt II. O vetor pAM470 foi gerado inserindo-se o fragmento de DNA LEU2<sup>-100 a 450</sup>-HISMX- LEU2<sup>1096 a 1770</sup>, que comprecnde dois segmentos do local LEU2 de *Saccharomyces cerevisiae* que se estende

da posição de nucleotídeo de -100 até a posição 450 e da posição de nucleotídeo de 1096 até a posição 1770, um marcador HISMX e um sítio de restrição *Xma*I não ativo entre a sequência LEU2<sup>1096 a 1770</sup> e o marcador HISMX, no vetor de clonagem TOPO TA pCR2.1. Os fragmentos de DNA

5 ERG8-P<sub>GAL</sub>-ERG19 e LEU2<sup>-100 a 450</sup>-HISMX-LEU2<sup>1096 a 1770</sup> foram gerados pela amplificação pela PCR como resumido na Tabela 5. Para a construção de pAM497, 400 ng de pAM475 e 100 ng de pAM470 foram digeridos até a conclusão usando a enzima de restrição *Xma*I, os fragmentos de DNA que

10 correspondem ao inserto ERG8-P<sub>GAL</sub>-ERG 19 e o vetor pAM470 linearizado foram purificados e 4 equivalentes molares do inserto purificado foram ligados com 1 equivalente molar do vetor linearizado purificado, produzindo o vetor pAM497. A Figura 4E para um mapa do inserto ERG8-P<sub>GAL</sub>-ERG19 e a SEQ ID NO: 5 mostram a sequência de nucleotídeo do inserto com

sequências LEU2 flangeadoras.

15 Tabela 5 – Reações de PCR realizadas para gerar pAM497

| Rodada de PCR | Padrão                                                                                                              | Iniciador 1                    | Iniciador 2                    | Produto de PCR                                                |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| 1             | 100 ng of Y007 DNA genômico                                                                                         | 61-67-CPK019-G (SEQ ID NO: 30) | 61-67-CPK020-G (SEQ ID NO: 31) | LEU2 <sup>-100 a 450</sup>                                    |
|               |                                                                                                                     | 61-67-CPK023-G (SEQ ID NO: 34) | 61-67-CPK024-G (SEQ ID NO: 35) | LEU2 <sup>1096 a 1770</sup>                                   |
|               | 10 ng de DNA de pAM330 plasmídico**                                                                                 | 61-67-CPK021-G (SEQ ID NO: 32) | 61-67-CPK022-G (SEQ ID NO: 33) | HISMX                                                         |
|               |                                                                                                                     | 61-67-CPK041-G (SEQ ID NO: 41) | 61-67-CPK060-G (SEQ ID NO: 54) | ERG8                                                          |
|               | 100 ng de DNA genômico Y002                                                                                         | 61-67-CPK061-G (SEQ ID NO: 55) | 61-67-CPK062-G (SEQ ID NO: 56) | P <sub>GAL</sub>                                              |
|               |                                                                                                                     | 61-67-CPK046-G (SEQ ID NO: 42) | 61-67-CPK063-G (SEQ ID NO: 57) | ERG19                                                         |
| 2             | 100 ng de cada um dos produtos de PCR purificados de LEU2 <sup>1096 a 1770</sup> e HISMX                            | 61-67-CPK021-G (SEQ ID NO: 32) | 61-67-CPK024-G (SEQ ID NO: 35) | HISMX-LEU2 <sup>1096 a 1770</sup>                             |
|               | 100 ng de cada um dos produtos de PCR purificados de ERG8 e P <sub>GAL</sub>                                        | 61-67-CPK041-G (SEQ ID NO: 41) | 61-67-CPK062-G (SEQ ID NO: 56) | ERG8-P <sub>GAL</sub>                                         |
| 3             | 100 ng de cada um dos produtos de PCR purificados de LEU2 <sup>-100 a 450</sup> e HISMX-LEU2 <sup>1096 a 1770</sup> | 61-67-CPK019-G (SEQ ID NO: 30) | 61-67-CPK024-G (SEQ ID NO: 35) | LEU2 <sup>-100 a 450</sup> -HISMX-LEU2 <sup>1096 a 1770</sup> |
|               | 100 ng de cada um dos produtos de PCR purificados de ERG8-P <sub>GAL</sub> e ERG19                                  | 61-67-CPK041-G (SEQ ID NO: 41) | 61-67-CPK046-G (SEQ ID NO: 42) | ERG8-P <sub>GAL</sub> -ERG19                                  |

\*\* O marcador HISMX em pAM330 originaram-se de pFA6a-HISMX6-PGAL1 como descrito por van Dijken *et al.* ((2000) Enzyme Microb. Technol. 26(9-10): 706-714).

## Exemplo 2

Este exemplo descreve métodos para fabricar plasmídeos e os fragmentos de DNA úteis nas formas de realização aqui fornecidas.

O plasmídeo pAM584 foi gerado inserindo-se o fragmento de DNA GAL7<sup>4 a 1021</sup>-HPH-GAL1<sup>1637 a 2587</sup> no vetor de clonagem TOPO ZERO Blunt II (Invitrogen, Carlsbad, CA). O fragmento de DNA GAL7<sup>4 a 1021</sup>-HPH-GAL1<sup>1637 a 2587</sup> compreende um segmento da ORF do gene GAL7 de *Saccharomyces cerevisiae* (GAL7 posições de nucleotídeo de 4 a 1021) (GAL7<sup>4 a 1021</sup>), o cassete de resistência à higromicina (HPH) e um segmento da região 3' não traduzida (UTR) do gene GAL1 de *Saccharomyces cerevisiae* (GAL1 posições nucleotídeo de 1637 a 2587). O fragmento de DNA foi gerado pela amplificação de PCR como resumido na Tabela 6. A Figura 4F mostra um mapa e a SEQ ID NO: 9 a sequência de nucleotídeo de fragmento de DNA GAL7<sup>4 a 1021</sup>-HPH-GAL1<sup>1637 a 2587</sup>

15 Tabela 6 – Reações de PCR realizadas para gerar pAM584

| Rodada de PCR                                                                                                                                                                                                                                                          | Padrão                                                                                                           | Iniciador 1                     | Iniciador 2                     | Produto de PCR                                            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| 1                                                                                                                                                                                                                                                                      | 100 ng de DNA genômico Y002                                                                                      | 91-014-CPK236-G (SEQ ID NO: 65) | 91-014-CPK237-G (SEQ ID NO: 66) | GAL7 <sup>4 a 1021</sup>                                  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                  | 91-014-CPK232-G (SEQ ID NO: 63) | 91-014-CPK233-G (SEQ ID NO: 64) | GAL1 <sup>1637 a 2587</sup>                               |
|                                                                                                                                                                                                                                                                        | 10 ng de DNA pAM547 plasmídico**                                                                                 | 91-014-CPK231-G (SEQ ID NO: 62) | 91-014-CPK238-G (SEQ ID NO: 67) | HPH                                                       |
| 2                                                                                                                                                                                                                                                                      | 100 ng de cada um dos produtos de PCR purificados de GAL7 <sup>4 a 1021</sup> e HPH                              | 91-014-CPK231-G (SEQ ID NO: 62) | 91-014-CPK236-G (SEQ ID NO: 65) | GAL7 <sup>4 a 1021</sup> -HPH                             |
| 3                                                                                                                                                                                                                                                                      | 100 ng de cada um dos produtos de PCR purificados de GAL1 <sup>1637 a 2587</sup> e GAL7 <sup>4 a 1021</sup> -HPH | 91-014-CPK233-G (SEQ ID NO: 64) | 91-014-CPK236-G (SEQ ID NO: 65) | GAL7 <sup>4 a 1021</sup> -HPH-GAL1 <sup>1637 a 2587</sup> |
| ** pAM547 plasmídico foi gerado sinteticamente e compreende o cassete HPH, que consiste da sequência codificadora para a higromicina B fosfotransferase de <i>Escherichia coli</i> flanqueada pelo promotor e terminador do gene Tefl de <i>Kluyveromyces lactis</i> . |                                                                                                                  |                                 |                                 |                                                           |

O fragmento de DNA GAL80<sup>-50 a -1</sup>-NatR-GAL80<sup>1309 a 1358</sup> foi gerado pela amplificação pela PCR. Os fragmentos de DNA incluem o gene marcador selecionável da resistência à nourseotricina de *Streptomyces noursei* (NatR) flanqueado em dois segmentos de 50 nucleotídeos cada que mapeiam

imediatamente a montante e imediatamente a jusante da região codificadora do gene GAL80 de *Saccharomyces cerevisiae* (GAL80 posição de nucleotídeo de -50 a -1 e 1309 a 1358; GAL80<sup>-50 a -1</sup> e GAL80<sup>1309 a 1358</sup>, respectivamente). A Figura 4G mostra um mapa e a SEQ ID NO: 8 a

5 sequência de nucleotídeo, do fragmento de DNA GAL80<sup>-50 a -1</sup>-NatR-GAL80<sup>1309 a 1358</sup>.

O fragmento de DNA GAL1<sup>1 a 48</sup>-NatR-GAL1<sup>1500 a 1550</sup> foi gerado pela amplificação pela PCR. O fragmento de DNA inclui o gene marcador selecionável de resistência à nourseotricina de *Streptomyces noursei*

10 (NatR) flanqueado em dois segmentos de 40 a 50 nucleotídeos cada que mapeiam para as extremidades 5' e 3' da região codificadora do gene GAL1 de *Saccharomyces cerevisiae* (GAL1 posição de nucleotídeo de 1 a 48 e 1500 a 1550; GAL1<sup>1 a 48</sup> e GAL1<sup>1500 a 1550</sup>, respectivamente). A Figura 4H mostra um mapa e SEQ ID NO: 68 a sequência de nucleotídeo do fragmento de DNA

15 GAL1<sup>1 a 48</sup>-NatR-GAL1<sup>1500 a 1550</sup>.

O plasmídeo de expressão pAM353 foi gerado inserindo-se uma sequência de nucleotídeo que codifica uma  $\beta$ -Farneseno sintase no vetor pRS425-Gal1 (Mumberg *et al.* (1994) Nucl. Acids. Res. 22(25): 5767-5768). O inserto de sequência de nucleotídeo foi gerado sinteticamente, usando como

20 um padrão a sequência codificadora do gene da  $\beta$ -Farneseno sintase de *Artemisia annua* (número de acesso no GenBank AY835398) otimizado no códon para a expressão em *Saccharomyces cerevisiae* (SEQ ID NO: 10). A sequência de nucleotídeo sinteticamente gerada foi flanqueada pelos sítios de restrição 5' *Bam*HI e 3' *Xho*I e assim pôde ser clonada em sítios de restrição

25 compatíveis de um vetor de clonagem tal como um vetor de origem pUC ou pACYC padrão. A sequência de nucleotídeo sinteticamente gerada foi isolada pela digestão até a conclusão da construção de síntese de DNA usando enzimas de restrição *Bam*HI e *Xho*I. A mistura de reação foi resolvida pela eletroforese em gel, o fragmento de DNA de aproximadamente 1,7 kb que

compreende a sequência codificadora da  $\beta$ -Farneseno sintase foi extraído em gel e o fragmento de DNA isolado foi ligado no sítio de restrição *BamHI XhoI* do vetor pRS425-Gal1, produzindo o plasmídeo de expressão pAM353.

O plasmídeo de expressão pAM404 foi gerado inserindo-se  
 5 uma sequência de nucleotídeo que codifica a  $\beta$ -farneseno sintase de *Artemisia annua*, otimizado no códon para a expressão em *Saccharomyces cerevisiae*, no vetor pAM178 (SEQ ID NO: 69). A sequência de nucleotídeo que codifica a  $\beta$ -Farneseno sintase foi amplificada pela PCR de pAM353 usando iniciadores 52 a 84 pAM326 *BamHI* (SEQ ID NO: 71) e 52 a 84 pAM326  
 10 *NheI* (SEQ ID NO: 72). O produto de PCR resultante foi digerido até a conclusão usando as enzimas de restrição *BamHI* e *NheI*, a mistura de reação foi resolvida pela eletroforese em gel, o fragmento de DNA de aproximadamente 1,7 kb que compreende a sequência codificadora da  $\beta$ -Farneseno sintase foi extraída em gel e o fragmento de DNA isolado foi  
 15 ligado no sítio de restrição *BamHI NheI* do vetor pAM178, produzindo o plasmídeo de expressão pAM404 (ver a Figura 5 para um mapa de plasmídeo).

### Exemplo 3

Este exemplo descreve a geração de cepas de *Saccharomyces*  
 20 *cerevisiae* úteis nas formas de realização aqui fornecidas.

As cepas de *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK2-1C Y002 e Y003 (MATA ou MATalfa; ura3-52; trp1289; leu2-3.112; his3A1; MAL2-8C; SUC2) (van Dijken *et al.* (2000) Enzyme Microb. Technol. 26(910): 706-714) foram preparados para a introdução de genes do caminho de MEV indutíveis  
 25 pela substituição do promotor de ERG9 com o promotor MET3 de *Saccharomyces cerevisiae* e a ORF de ADE1 com o gene LEU2 de *Candida glabrata* (CgLEU2). Isto foi feito pela amplificação de PCR a região KanMX-PmEt3 de vetor pAM328 (SEQ ID NO: 6), que compreende o promotor P<sub>MET3</sub> precedido por um marcador de resistência à canamicina flanqueado pelo

promotor e terminador do gene Tell de *Kluyveromyces lactis*, usando iniciadores 50-56-pw100-G (SEQ ID NO: 10) e 50-56-pw101-G (SEQ ID NO: 11), que incluem 45 pares de base de homologia ao promotor de ERG9 nativo, transformando 10 µg do produto de PCR resultante nas células Y002 e

5 Y003 que crescem exponencialmente usando 40 % p/p de Polietileno Glicol 3350 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 100 mM de Acetato de Lítio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e 10 µg de DNA de Esperma de Salmão (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) e incubando as células a 30° C por 30 minutos seguidos pela submissão das mesmas ao choque térmico a 42° C por 30 minutos  
10 (Schiestl e Gietz (1989) Curr. Genet. 16: 339-346). Os recombinantes positivos foram identificados pela sua capacidade para crescer em meio rico contendo 0,5 µg/ml de Geneticina (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) e as colônias selecionadas foram confirmadas pela PCR de diagnóstico. Aos clones resultantes foram dados a designação Y93 (MAT A) e Y94 (MAT  
15 alfa). O local genômico CgLEU2 de 3,5 kb foi depois amplificado a partir do DNA genômico de *Candida glabrata* (ATCC, Manassas, VA) usando iniciadores 61-67-CPK066-G (SEQ ID NO: 60) e 61-67-CPK067-G (SEQ ID NO: 61), que contêm 50 pares de base de homologia flanqueadora para a ORF de ADEJ e 10 µg do produto de PCR resultante foram transformados em  
20 células Y93 e Y94 que crescem exponencialmente, os recombinantes positivos foram selecionados quanto ao crescimento na ausência de suplementação de leucina e clones selecionados foram confirmados pela PCR de diagnóstico. Aos clones resultantes foram dadas a designação Y176 (MAT A) e Y177 (MAT alfa).

25 A cepa Y188 foi gerada pela digestão de DNA plasmídico pAM491 e pAM495 até a conclusão usando a enzima de restrição *PmeI* (New England Biolabs, Beverly, MA) e introduzir os insertos de DNA purificados nas células Y176 que crescem exponencialmente. Os recombinantes positivos foram selecionados quanto ao crescimento em meio que carece de uracila e

histidina e a integração no local genômico correto foi confirmada pela PCR de diagnóstico.

A cepa Y189 foi gerada pela digestão do DNA plasmídeos pAM489 e pAM497 até a conclusão usando a enzima de restrição *PmeI* e introduzindo os insertos de DNA purificados em células Y177 que cresce exponencialmente. Os recombinantes positivos foram selecionados quanto ao crescimento em meio que carece de triptofano e histidina e a integração no local genômico correto foi confirmada pela PCR de diagnóstico.

Aproximadamente  $1 \times 10^7$  células das cepas Y188 e Y189 foram misturados em uma placa de meio YPD por 6 horas na temperatura ambiente para possibilitar quanto o empareiramento. A cultura de célula mista foi plaqueada ao meio que carece de histidina, uracila e triptofano para selecionar quanto ao crescimento de células diplóides. A cepa Y238 foi gerada pela transformação das células diplóides usando DNA plasmídico de pAM493 que foi digerido até a conclusão usando a enzima de restrição *PmeI* e introduzir o inserto de DNA purificado nas células diplóides que crescem exponencialmente. Os recombinantes positivos foram selecionados quanto ao crescimento em meio que carece de adenina e a integração no local genômico correto foi confirmado pela PCR de diagnóstico.

A cepa Y211 haplóide (MAT alfa) foi gerada pela cepa esporulante Y238 em 2 % de acetato de potássio e 0,02 % de meio líquido de Rafinose, isolando aproximadamente 200 tétrades genéticas usando um micromanipulador série MSM300 da Singer Instruments (Singer Instrument LTD, Somerset, UK), identificando isolados genéticos independentes contendo o complemento apropriado de material genético introduzido pela sua capacidade para crescer na ausência de adenina, histidina, uracila e triptofano e confirmando a integração de todos os DNA introduzidos pela PCR de diagnóstico.

A cepa Y227 foi gerada a partir da cepa Y211 tornando-se a

cepa capaz de converter FPP a amorfa-4,11-dieno. Para esta finalidade, as células Y211 exponencialmente crescentes foram transformadas com plasmídeo de expressão pAM426 (SEQ ID NO: 7), que compreende um promotor GAL1 operavelmente ligado à sequência codificadora de um gene da amorfa-4,11-dieno sintase que é otimizado no códon para a expressão em *Saccharomyces cerevisiae* (Merke *et al.* (2000) *Ach. Biochem. Biophys.* 381: 173-180). Os transformantes de célula hospedeira foram selecionados em meio definido sintético completo que carece de leucina.

A cepa Y293 foi gerada a partir da cepa Y227 pela deleção da sequência codificadora do gene GAL80 e assim tornando os promotores de GAL na cepa constitutivamente ativa. Para esta finalidade, as células Y227 que crescem exponencialmente foram transformadas com fragmento de DNA GAL80<sup>-5 a -1</sup>-NatR- GAL80<sup>1309 a 1358</sup>. Os transformantes de célula hospedeira foram selecionados em YPD ágar contendo 100 µg/ml de nourseotricina, colônias únicas foram escolhidas e a integração no local genômico correto foi confirmado pela PCR de diagnóstico.

A cepa Y337 foi gerada a partir da cepa Y227 tornando-se a cepa incapaz de catabolizar galactose. Para esta finalidade, o DNA plasmídico pAM584 foi digerido até a conclusão usando a enzima de restrição *PmeI* e o inserto de DNA purificado GAL7<sup>4 a 1021</sup>-HPH-GAL1<sup>1637 a 2587</sup> foi introduzido nas células Y227 que crescem exponencialmente. Os recombinantes positivos foram selecionados quanto ao crescimento em YPD ágar contendo higromicina B (Sigma, St. Louis, MO). A integração no local genômico correto foi confirmado pela PCR de diagnóstico e testando-se a cepa quanto a incapacidade para usar galactose como uma fonte de carbono.

A cepa Y351 foi gerada a partir da cepa Y211 tornando-se a cepa incapaz de catabolizar a galactose. Para esta finalidade, o DNA plasmídico de pAM584 foi digerido até a conclusão usando a enzima de restrição *PmeI* e o inserto de DNA purificado GAL7<sup>4 a 1021</sup>-HPH-GAL1<sup>1637 a</sup>

<sup>2587</sup> foi introduzido na Y211 que cresce exponencialmente. Os transformantes de célula hospedeira foram selecionados em YPD ágar contendo higromicina B. A integração no local genômico correto foi confirmado pela PCR de diagnóstico e testando-se a cepa quanto a incapacidade para usar galactose como uma fonte de carbono.

A cepa Y352 foi gerada a partir da cepa Y351 tornando-se a cepa capaz de produzir a  $\beta$ -Farneseno sintase. Para esta finalidade, as células Y351 que crescem exponencialmente foram transformadas com plasmídeo de expressão pAM404. Os transformantes de célula hospedeira foram selecionados no meio definido sintético completo que carece de leucina.

A cepa Y283 foi gerada a partir da cepa Y227 pela deleção da sequência codificadora do gene GAL1 e assim tornando a cepa incapaz de catabolizar galactose. Para esta finalidade, as células Y227 que crescem exponencialmente foram transformadas com o fragmento de DNA GAL1<sup>1 a 48</sup>-NatR-GAL1<sup>1500 a 1550</sup>. Os transformantes de célula hospedeira foram selecionados em YPD ágar contendo 100  $\mu$ g/ml de nourseotricina, as colônias únicas foram escolhidas, e a integração no local genômico correto foi confirmada pela PCR de diagnóstico e cultivando-se a cepa em ágar contendo glicerol e 2-desoxigalactose (um GAL1p funcional converteria o último em uma toxina).

A cepa Y221 foi gerada a partir da cepa Y211 pela transformação de células Y211 que cresce exponencialmente com vetor pAM178 (SEQ ID NO: 69). Os transformantes positivos foram selecionados quanto ao crescimento em meio sintético completo que carece de leucina.

A cepa Y290 foi gerada a partir da cepa Y221 pela deleção da sequência codificadora do gene GAL80 e assim tornando os promotores GAL na cepa constitutivamente ativos.

A cepa Y318 foi gerada a partir da cepa Y290 triando-se colônias para a perda do vetor pAM178.

A cepa 409 foi gerada a partir da cepa Y318 tornando-se a cepa capaz de produzir a  $\beta$ -Farneseno sintase na presença de galactose. Para esta finalidade, células Y318 que cresce exponencialmente foram transformadas com plasmídeo de expressão pAM404. Os transformantes de  
5 célula hospedeira foram selecionados em meio definido sintético completo que carece de leucina.

A cepa Y419 foi gerada a partir da cepa Y409 tornando-se os promotores GAL na cepa constitutivamente ativos e capazes de expressar níveis mais altos de GAL4p na presença de glicose (isto é, capaz de direcionar  
10 a expressão mais eficientemente para fora dos promotores indutíveis por galactose na presença de glicose, assim como garantem que exista fator de transcrição Gal4p o suficiente para direcionar a expressão de todos os promotores indutíveis por galactose na célula). Para esta finalidade, o marcador KanMX no local ERG9 na cepa Y409 foi substituído por um  
15 fragmento de DNA que compreendeu a ORF do gene GAL4 de *Saccharomyces cerevisiae* sob o controle de uma versão “constitutiva operativa” do seu promotor nativo (Griggs & Johnston (1991) PNAS 88(19): 8597-8601) e o terminador GAL4 ( $P_{gal4OC}$ -GAL4- $T_{GAL4}$ ) e o gene marcador selecionável de resistência à nourseotricina de *Streptomyces noursei* (NatR)  
20 flanqueado pelo promotor e terminador do gene Tefl de *Kluyveromyces lactis*.

A cepa Y677 foi gerada a partir da cepa Y419 pela introdução de uma outra cópia da região codificadora de mevalonato cinase sob o controle de  $P_{GAL1}$  no local GAL80.

Os bancos de célula de cepas Y293, Y283, Y352 e Y677  
25 foram preparados cultivando-se as células em meio de semeadura a 30° C até que elas atingissem uma  $OD_{600}$  dentre 2 e 5. Neste tempo, os frascos foram colocados em gelo. Três partes da cultura e 2 partes de glicerol a 50 % estéril gelado foram combinadas e 1 ml de alíquotas desta mistura foram congeladas a -80° C em criofrascos. O mesmo procedimento foi usado para a cepa Y337,

entretanto a OD<sub>600</sub> para esta cepa foi 13,6 no momento que ela foi congelada.

#### Exemplo 4

Este exemplo descreve a produção de amorfa-4,11-dieno pelas

- 5 células hospedeiras na fermentação de lote alimentado, restrita em carbono com uma alimentação apenas de glicose.

Culturas de semente Y337 foram preparadas pela inoculação de um frasco congelado de 1 ml em um frasco de 250 ml contendo 50 ml de meio de semente (Tabela 7). Depois de ~24 horas de cultivo a 30° C, 0,5 ml da cultura foi sub-cultivado em frascos de 250 ml adicionais cada um contendo 50 ml de meio de semente. As culturas de semente foram cultivadas a 30° C durante a noite a uma OD<sub>600</sub> de aproximadamente 3 a 12. Os frascos foram reunidos e usados para inocular biorreatores contendo meio de batelada (Tabela 8) a 10 % v/v.

#### 15 Tabela 7 – Meio de Semeadura

| Componente                                                                                                                                                                                                                                 | Meio de semeadura |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| Água de torneira (ml/L)                                                                                                                                                                                                                    | 350               |
| 2x base de lote (ml/L) <sup>a)</sup>                                                                                                                                                                                                       | 500               |
| 715 g/L de glicose monoidratada (ml/L) <sup>b)</sup>                                                                                                                                                                                       | 30                |
| Solução de vitamina de levedura (ml/L) (Tabela 9)                                                                                                                                                                                          | 12                |
| Solução de metais traço de levedura (ml/L) (Tabela 9)                                                                                                                                                                                      | 10                |
| Succinato (0,5 M, pH 5,0) (ml/L) <sup>a)</sup>                                                                                                                                                                                             | 100               |
| a) 16 g/L de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 30 g/L de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> e 12,3 g/L de MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O (Nota: nenhum aquecimento durante a mistura destes componentes)                |                   |
| b) A solução de estoque de glicose monoidratada foi preparada dissolvendo-se o açúcar em água com aquecimento, que permite a solução esfriar e ser esterilizada por filtração.                                                             |                   |
| c) A solução de estoque de succinato foi preparada dissolvendo-se o ácido succínico em água com aquecimento, deixando a solução esfriar, ajustando o pH a 5,05 com NaOH e esterilizando a solução pela autoclavagem (45 minutos a 121° C). |                   |

#### Tabela 8 – Meio de Batelada de Biorreator

| Componente                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Meio de Lote |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| Água de torneira (ml/L)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 350          |
| 2x base de batelada (ml/L) (Tabela 7)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 500          |
| glicose (g/L)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 19,5         |
| Solução de vitamina de levedura (ml/L) (Tabela 9)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 12           |
| Solução de metais traço (ml/L) (Tabela 9)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 10           |
| O meio de batelada foi preparado combinando-se 2x a base de batelada com água de torneira em um biorreator de 2L, autoclavando-se a unidade e em uma capela estéril levar o volume da solução para 90 % do final pela adição de concentrada soluções de estoque esterilizadas em filtro de açúcar, vitaminas e metais traço. Os 10 % remanescentes do volume de partida foi da cultura de |              |

semente.

Tabela 9 – Soluções de estoque de vitamina e metais traço

| Componente            | Solução de vitamina de levedura (g/L) <sup>a)</sup> |  | Componente                                          | solução de metais traço levedura (g/L) <sup>b)</sup> |
|-----------------------|-----------------------------------------------------|--|-----------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| Biotina               | 0,05                                                |  | ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O                | 5,75                                                 |
| Pantotenato de cálcio | 1                                                   |  | MnCl <sub>2</sub> *4H <sub>2</sub> O                | 0,32                                                 |
| Ácido nicotínico      | 1                                                   |  | CuSO <sub>4</sub> anidro                            | 0,32                                                 |
| Mioinositol           | 25                                                  |  | CoCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O                | 0,47                                                 |
| tiamina HCl           | 1                                                   |  | Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O | 0,48                                                 |
| piridoxol HCl         | 1                                                   |  | CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O                | 2,9                                                  |
| Ácido p-aminobenzoico | 0,2                                                 |  | FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O                | 2,8                                                  |
|                       |                                                     |  | 0,5 M EDTA                                          | 80 (ml/L)                                            |

a) A biotina foi primeira dissolvida em 10 ml de NaOH 5 M e depois adicionada à água DI (750 ml/L). O pH foi ajustado a 6,5 usando NaOH ou HCl 5 M e mais uma vez ajustado depois da adição de cada vitamina. Depois que todas as vitaminas foram dissolvidas, a solução foi levada ao volume final com água DI e esterilizada por filtração. O frasco foi coberto em folha de alumínio e armazenado a 4° C.

b) EDTA foi primeiro adicionado à água DI (750 ml/L) antes que o ZnSO<sub>4</sub> fosse dissolvido. O pH foi ajustado a 6,0 usando NaOH 5 M e mais uma vez ajustado depois da adição de cada metal. Depois que todos os metais foram dissolvidos, o pH foi ajustado a 4,0 usando HCl 5 M e a solução foi levada ao volume final com água DI e esterilizados por filtração. O frasco foi coberto com folha de alumínio e armazenado a 4° C.

O pH da fermentação foi controlada automaticamente e mantida no pH 5 com a adição de NH<sub>4</sub>OH 10 N. A temperatura foi mantida a 30° C. O fluxo de ar foi fornecido a uma taxa de 1 LPM. O oxigênio dissolvido foi mantido a 40 % com uma cascata de agitação seguida pelo enriquecimento de oxigênio. A espuma foi controlada com antiespumante Biospumex 200 K.

A cultura em biorreator foi deixada crescer até que a glicose no meio de batelada estivesse esgotada, ponto no qual, uma alimentação de glicose exponencial foi iniciada para a qual o meio de alimentação de glicose (Tabela 10) foi bombeado para dentro do biorreator na taxa definida pelas seguintes equações:

$$F = V\mu_{rel}S_B e^{\mu_m(t-t_0)}$$

$$V = V_0 + V_{Alimentação}$$

F é a taxa de fluxo da massa de substrato (g/h), V é o volume

de líquido no biorreator em um dado tempo (L),  $S_B$  é a concentração de substrato no meio de batelada (20 g/L),  $\mu_{set}$  é a taxa de alimentação específica ( $0,087 \text{ h}^{-1}$ ),  $t$  é a idade do lote (h),  $t_0$  é a idade do lote quando a alimentação foi iniciada (h),  $V_0$  é o volume inicial no biorreator e  $V_{feed}$  é o volume total de alimentação adicionado ao biorreator em um dado tempo (L). A fase de alimentação exponencial continuou até que a razão de  $F/V$  atingiu uma taxa de alimentação pré-ajustada máxima (Tabela 11). Depois de atingir este máximo, a razão de  $F/V$  foi mantida constante pelo resto do processo em uma taxa de alimentação pré-ajustada estacionária (Tabela 11).

10 Tabela 10 – Meio de alimentação do biorreator

| Meio Base                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                              |                                         |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------------|
| Componente                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Meio de Alimentação de Glicose <sup>a)</sup> | Meio de Alimentação Misto <sup>b)</sup> |
| glicose monoidratada (g/L) <sup>a)</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 650                                          | 425                                     |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (g/L)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 9                                            | 9                                       |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g/L)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 5,12                                         | 5,12                                    |
| $\text{K}_2\text{SO}_4$ (g/L)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 3,5                                          | 3,5                                     |
| $\text{Na}_2\text{SO}_4$ (g/L)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 0,28                                         | 0,28                                    |
| Componentes Suplementares                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                              |                                         |
| Solução de vitamina de levedura (ml/L) (Tabela 9)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 12                                           | 12                                      |
| Solução de metais traço de levedura (ml/L) (Tabela 9)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 10                                           | 10                                      |
| Etanol a 95 % (v/v) (ml/L)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 0                                            | 237                                     |
| a) O meio de alimentação de glicose foi preparado misturando-se glicose monoidratada, $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , $\text{K}_2\text{SO}_4$ e $\text{Na}_2\text{SO}_4$ em água de torneira a $38^\circ \text{C}$ , esfriando a solução, esterilizando por filtração, adicionando os componentes suplementares (soluções de estoque esterilizadas por filtração concentradas de metais traço e vitaminas) em uma capela estéril e levando a solução ao volume final pela adição de água estéril.                                                                                                                                                                                                                                           |                                              |                                         |
| b) O meio de alimentação misto foi preparado misturando-se glicose, $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , $\text{K}_2\text{SO}_4$ e $\text{Na}_2\text{SO}_4$ em 300 ml de $38^\circ \text{C}$ de água de torneira, aquecendo a mistura até aproximadamente $100^\circ \text{C}$ para dissolver totalmente o açúcar e sais, adicionando água para levar o volume a 750 ml, esfriando a solução, esterilizando por filtração usando um filtro de 0,2 micron, adicionando primeiro 237 ml de etanol a 95 % (v/v) e adicionando os componentes suplementares (soluções de estoque esterilizadas por filtração concentradas de metais traço e vitaminas) em uma capela estéril e levando a solução ao volume final de 1 L pela adição de água estéril. |                                              |                                         |

A produção de amorfa-4,11-dieno foi induzida a uma  $\text{OD}_{600}$  de 50 por cerca de 24 horas depois da inoculação com a adição de 10 g/L de galactose ao biorreator e à garrafa de alimentação (22,2 ml de uma solução de estoque de galactose de 450 g/L por litro de volume de cultura). Além disso,

0,25 g/L de metionina foi adicionado ao biorreator e 1 g/L de metionina foi adicionado à garrafa de alimentação para reprimir a transcrição do gene ERG9 (10 ml de uma solução de estoque de metionina de 25 g/L por litro de volume de cultura e 40 ml de uma solução de estoque de metionina de 25 g/L

5 por litro de volume de alimentação) e 10 % v/v de oleato de metila autoclavado foram adicionados ao biorreator para capturar o amorfa-4,11-dieno. (A solução de estoque de galactose de 450 g/L foi preparada dissolvendo-se o açúcar em água com aquecimento, permitindo que a solução esfrie e esterilizando por filtração. A solução de estoque de 25 g/L de  
10 metionina foi preparada dissolvendo-se metionina em água e esterilizando por filtração a solução.

As amostras foram coletadas em vários pontos de tempo e diluídas a uma razão de 1:20 em metanol. Cada amostra diluída foi turbilhonada por 30 minutos e os fragmentos de cultura foram girados. Os  
15 títulos de amorfa-4,11-dieno foram determinados transferindo-se de 5 a 10 µl do sobrenadante para um frasco de vidro limpo contendo 990 a 995 µl de acetato de etila reforçado com trans-cariofileno como um padrão interno. As amostras de acetato de etila foram analisadas em um cromatógrafo a gás Agilent 7890N equipado com um detetor de ionização de chama (Agilent  
20 Technologies Inc., Palo Alto, CA). Os compostos em uma alíquota de 1 µl de cada amostra foram separadas usando uma coluna DB Wax (Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, CA), gás carregador de hélio e o seguinte programa de temperatura: 220° C mantido por 3 minutos, aumentando a temperatura a 100° C/minuto para uma temperatura de 260° C. Usando este  
25 protocolo, amorfa-4,11-dieno tem um tempo de retenção de aproximadamente 3,4 minutos. Os títulos de amorfa-4,11-dieno foram calculados comparando-se as áreas de pico geradas contra uma curva de calibração quantitativa de amorfa-4,11-dieno purificado em acetato de etila reforçado com trans-cariofileno.

Como mostrado na Tabela 11 e Figura 6, a cepa Y337 produziu 2,4 g/L de amorfa-4,11-dieno (AD) em 114 horas depois do início da fermentação no processo alimentado apenas com glicose.

Tabela 11 - Produção de amorfa-4,11-dieno pela cepa Y337 usando uma alimentação de glicose ou uma alimentação mista de glicose/etanol

| Glicose no Meio de Alimentação (g/L) | Etanol no Meio de Alimentação (g/L) | Taxa de Alimentação Máxima (g/h/L) <sup>a)</sup> | Taxa de Alimentação Estacionária (g/h/L) <sup>a)</sup> | Título AD Máximo (g/L) | Rendimento no Título Máximo (mg de produto/g de substrato) |
|--------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|------------------------|------------------------------------------------------------|
| 545                                  | 0                                   | 10                                               | 10                                                     | 2,4                    | 5,4                                                        |
| 340                                  | 180                                 | 8,6                                              | 8,6                                                    | 16,5                   | 38,7                                                       |
| 340                                  | 180                                 | 8,6                                              | 4,3                                                    | 12,6                   | 50,3                                                       |

a) g/h/L é g de substrato/h/L de volume de biorreator.

### Exemplo 5

Este exemplo descreve a produção de amorfa-4,11-dieno pelas células hospedeiras no lote alimentado, a fermentação restrita em carbono com uma alimentação mista de glicose-etanol.

As culturas de semente Y337 foram preparadas e usadas para inocular biorreatores como descrito no Exemplo 4. As fermentações foram realizadas e as amostras foram analisadas, essencialmente como descrito no Exemplo 4 com as seguintes modificações.

Durante a fase inicial da fermentação, um pouco da glicose no meio de batelada foi convertido para etanol. A cultura no biorreator foi deixada crescer até que a glicose e o etanol no meio de batelada estivessem esgotados, ponto no qual uma alimentação exponencial foi iniciada para o que o meio de alimentação misto (Tabela 10) foi bombeado para dentro do biorreator na taxa definida pelas seguintes equações:

$$F = V\mu_{set}S_B e^{\mu_{set}(t-t_0)}$$

$$V = V_0 + V_{\text{Alimentação}}$$

F é a taxa de fluxo da massa de substrato (g/h), V é o volume líquido no biorreator em um dado tempo (L),  $S_B$  é a concentração de substrato no meio de batelada (20 g/L),  $\mu_{set}$  é a taxa de alimentação específica (0,087 h<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>),  $t$  é a idade do lote (h),  $t_0$  é a idade do lote quando a alimentação foi iniciada (h),  $V_0$  é o volume inicial no biorreator e  $V$  é o volume total de alimentação adicionado ao biorreator em um dado tempo (L). A fase de alimentação exponencial continuou até que a razão de FN atingisse uma taxa de  
 5 alimentação pré-ajustada máxima em unidades de g de substrato/h/L de volume do biorreator (Tabela 11). Depois de atingir este máximo, a razão de  $F/V$  foi mantida constante pelo resto do processo em uma taxa de alimentação pré-ajustada estacionária (Tabela 11).

10 A produção de amorfa-4,11-dieno foi induzida em uma  $OD_{600}$  de 77 por cerca de 40 horas depois da inoculação.

Como mostrado na Tabela 11 e Figura 6, a cepa Y337 produziu até 16,5 g/L de amorfa-4,11-dieno em 118 horas depois do início da fermentação na fermentação alimentada com glicose e etanol mista.

#### Exemplo 6

15 Este exemplo descreve a produção de amorfa-4,11-dieno pelas células hospedeiras em fermentação de lote alimentado, alimentada por pulso com uma alimentação apenas de etanol.

As culturas de semente Y293 foram preparadas e usadas para inocular biorreatores como descritos no Exemplo 3. As fermentações foram  
 20 realizadas e as amostras foram analisadas, essencialmente como descrito no Exemplo 4 com as seguintes modificações:

Durante a fase inicial da fermentação, um pouco da glicose no meio de batelada foi convertida para etanol. A cultura do biorreator foi deixada crescer até que a glicose e o etanol no meio de batelada estivessem  
 25 esgotados, ponto no qual uma alimentação pulsada de etanol foi iniciada. A taxa da alimentação foi controlada pelo percentual de  $CO_2$  no gás desprendido (a taxa de evolução de  $CO_2$ ; CER), que foi monitorado com um analisador de gás desprendido e um algoritmo computadorizado que designou uma variável ( $C_{max}$ ) para a CER máxima que rastreou o valor máximo de porcentagem de

CO<sub>2</sub> no gás desprendido. Durante o cultivo em glicose, a CER evoluiu rapidamente (Figura 7B). Quando a glicose estava esgotada do meio de batelada, a CER caiu abaixo de 50 % de  $C_{max}$  e o algoritmo de computador restaurou a  $C_{max}$  para o valor de CO<sub>2</sub> depois da queda. Quando o etanol

5 produzido a partir da glicose em excesso no meio de batelada estivesse esgotada, a CER caiu uma segunda vez. A alimentação pulsada foi deflagrada automaticamente quando a CER caiu abaixo de 75 % da  $C_{max}$  corrente. A bomba injetou 75 % (v/v) do etanol no biorreator em 5 minutos, liberando aproximadamente 10 g de etanol à cultura. A  $C_{max}$  foi reajustada ao valor do  
10 CO<sub>2</sub> percentual no gás desprendido tempo no qual a bomba foi desligada e depois reinstalar o rastreamento dos aumentos na evolução de CO<sub>2</sub> e a bomba foi reativada quando a CER mais uma vez caiu abaixo de 75 % da  $C_{max}$  recém ajustada. O algoritmo de alimentação foi repetido por toda a fermentação (Figuras 7A) e garantiu que a cultura não fosse alimentada em excesso com  
15 etanol. Porque nenhuma das soluções dos sais, metais traço, vitaminas, açúcares ou aminoácido foram solúveis na alimentação de etanol, os componentes da alimentação concentrados (Tabela 12) foram combinados e injetados através da um septo na placa de topo do biorreator uma vez ao dia de acordo com quanto do volume de etanol foi liberado desde a adição  
20 anterior de componentes alimentados.

**Tabela 12 – Componentes de Alimentação Concentrada**

| Componente                                                                                                                                                                             | Quantidade (ml/L de etanol) |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| glicose (450 g/L)                                                                                                                                                                      | 24                          |
| metionina (25 g/L)                                                                                                                                                                     | 40                          |
| 10x base de alimentação <sup>a)</sup>                                                                                                                                                  | 100                         |
| Solução de vitamina levedura (ml/L) (Tabela 9)                                                                                                                                         | 12                          |
| Solução de metal traço de levedura (Tabela 9)                                                                                                                                          | 10                          |
| a) 90 g/L de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 51,2 g/L de MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O, 35 g/L de K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> e 2,8 g/L de Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> |                             |

Dez horas depois que a glicose estivesse esgotada do meio de batelada, 0,25 g/L de metionina foi adicionado ao biorreator através da placa de topo e 10 % v/v de oleato de metila autoclavado foi bombeado no vaso.  
25 (Visto que a cepa Y293 compreende um gene GAL80 rompido, a galactose

não foi necessária para induzir a produção de amorfa-4,11-dieno).

Como mostrado na Figura 7B, a cepa Y293 produziu 36 g/L de amorfa-4,11-dieno.

### Exemplo 7

5 Este exemplo descreve a produção de amorfa-4,11-dieno pelas células hospedeiras no lote alimentado, a fermentação restrita em carbono apenas com uma alimentação de etanol.

As culturas de semente Y293 foram preparadas e usadas para inocular biorreatores contendo meio de batelada (Tabela 13) como descrito no

10 Exemplo 3.

Tabela 13 – Meio de Biorreator

| Componente                                            | Meio de batelada |
|-------------------------------------------------------|------------------|
| glicose-H <sub>2</sub> O (715 g/L) (ml/L)             | 19,5             |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g/L) | 15               |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)                 | 26               |
| MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O (g/L)            | 16,4             |
| K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g/L)                  | 7                |
| Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g/L)                 | 0,56             |
| Solução de vitamina de levedura (ml/L) (Tabela 9)     | 46,3             |
| Solução de metal traço de levedura (ml/L) (Tabela 9)  | 38,5             |

As fermentações foram realizadas e as amostras foram analisadas, essencialmente como descrito no Exemplo 4 com as seguintes modificações:

15 A cultura de biorreator foi deixada cultivar até que a glicose no meio de batelada estivesse esgotada, ponto no qual uma alimentação exponencial foi iniciada para o que o meio de alimentação de glicose (Tabela 10) foi bombeado para dentro do biorreator na taxa definida pelas seguintes equações:

$$F = V\mu_{set}S_B e^{\mu_{set}(t-t_0)}$$

$$V = V_0 + V_{\text{Alimentação}}$$

20 F é a taxa de fluxo de massa de substrato (g/h), V é o volume líquido no fermentador a um dado tempo (L), S<sub>B</sub> é a concentração de substrato

no meio de batelada (20 g/L),  $\mu_{\text{set}}$  é a taxa de alimentação específica ( $0,087 \text{ h}^{-1}$ ),  $t$  é a idade do lote (h),  $t_0$  é a idade do lote quando a alimentação foi iniciada (h),  $V_0$  é o volume inicial no fermentador e  $V_{\text{feed}}$  o volume total de alimentação adicionada ao fermentador em um dado tempo (L). A

- 5 alimentação exponencial continuou até que a taxa de alimentação máxima de 7,1 g/h/L foi atingida ( $\text{OD}_{600}$  de aproximadamente 50). Ponto no qual a alimentação foi mudada para uma alimentação de etanol (190 *proof*) e a taxa de alimentação foi ajustada a um valor volumétrico constante de 2,5 g/h/L durante o resto da fermentação. Com esta taxa de alimentação programada, as
- 10 taxas de consumo de etanol foram controladas e variaram de 0,4 a 1,75 g de etanol/g de DCW/dia.

Como mostrado na Figura 8, a cepa Y293 produziu 37 g/L de amorfa-4,11-dieno em 187 horas depois do início da fermentação.

### Exemplo 8

- 15 Este exemplo descreve a produção de Farneseno pelas células hospedeiras na fermentação de lote alimentado, restrita em carbono apenas com uma alimentação de etanol.

- As culturas de semente Y677 foram preparadas e usadas para inocular dois biorreatores cada um contendo 630 ml de meio de batelada
- 20 (Tabela 14) como descrito no Exemplo 3. A um dos dois biorreatores, 200 ml de oleato de metila foram adicionados para a captura de produto. As fermentações foram realizadas e as amostras foram analisadas, essencialmente como descrito no Exemplo 4 com as seguintes modificações:

Tabela 14 – Meio de Biorreator

| Componente                                           | Meio de batelada |
|------------------------------------------------------|------------------|
| Glicose (g/L)                                        | 39,03            |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/L)                   | 15               |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (g/L)                       | 33,7             |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g/L)      | 20,77            |
| $\text{K}_2\text{SO}_4$ (g/L)                        | 10               |
| $\text{Na}_2\text{SO}_4$ (g/L)                       | 0,8              |
| Solução de vitamina de levedura (ml/L) (Tabela 9)    | 32,4             |
| Solução de metal traço de levedura (ml/L) (Tabela 9) | 27               |

Durante a fase inicial das fermentações, um pouco da glicose no meio de batelada foi convertida para etanol. As culturas de biorreator foram deixadas cultivar até que a glicose e o etanol no meio de batelada fossem esgotados, ponto no qual, uma alimentação exponencial foi iniciada para o que etanol puro (190 *proof*) foi bombeado para dentro do biorreator na taxa definida pelas seguintes equações:

$$F = V\mu_{set}S_B e^{\mu_{set}(t-t_0)}$$

$$V = V_0 + V_{\text{Alimentação}}$$

F é a taxa de fluxo de massa de substrato (g/h), V é o volume líquido no fermentador em um dado tempo (L),  $S_B$  é a concentração de substrato no meio de batelada (39,03 g/L),  $\mu_{set}$  é a taxa de alimentação específica ( $0,058 \text{ h}^{-1}$ ), t é a idade do lote (h),  $t_0$  é a idade do lote quando a alimentação foi iniciada (h),  $V_0$  é o volume inicial no fermentador (0,7 L) e  $V_{\text{feed}}$  o volume total de alimentação adicionado ao fermentador em um dado tempo (L). A fase de alimentação exponencial continuou até que a razão de F/V atingiu uma taxa de alimentação máxima de 5 g de substrato/h/L de volume de biorreator. Depois de atingir este máximo, a razão de F/V foi mantida constante durante o resto do processo em uma taxa de alimentação estacionária de 2,5 g/h/L. Entretanto, como mostrado na Figura 9A, a taxa relativamente lenta de utilização de etanol no começo da fase de alimentação exponencial resultou no acúmulo de etanol. Este acúmulo necessitou o ajuste manual das taxas de alimentação pré-ajustadas (Figura 9B) e um aumento no tempo que duplica a taxa de alimentação de 12 para 14 horas para manter um processo limitado em carbono. As células cultivadas na presença de oleato de metila rapidamente recuperou e reassumiu o crescimento até o máximo pré-ajustado e taxas de alimentação estacionárias (Figura 9C). ao contrário, a cultura que não conteve nenhum oleato de metila foi mais lenta para consumir o etanol acumulado e assim requereu uma segunda suspensão da alimentação estacionária seguida por uma redução da taxa de alimentação estacionária de

2,5 g/h/L para 1,25 g/h/L. No geral, a cepa Y677 teve uma taxa de consumo de etanol de 0 a 2,1 g de etanol /g de DCW/dia na ausência de oleato de metila e de 0,27 a 2,9 g de etanol/g de DCW/dia na presença de oleato de metila.

5 O gás de desprendimento do biorreator foi levado através de um condensador para medir a taxa de captação de oxigênio (OUR) e a geração de CO<sub>2</sub> (CER) usando um espectrômetro de massa de gás de desprendimento. A Figura 9D mostra a CER e OUR da cepa Y677 na presença de oleato de metila.

10 As densidades de célula e o consumo de etanol foram monitorados pela amostragem duas vezes ao dia. Em cada ponto de tempo, 1 ml de amostras de caldo foram coletadas e diluídas 1:1000 em água e a densidade de célula foi medida usando um espectrofotômetro ajustado a 600 nm de comprimento de onda.

15 Os níveis de etanol foram quantificados pela HPLC. Em cada ponto de tempo, uma amostra de 1 ml de caldo foi coletada e diluída 2x em solução 30 mM de ácido sulfúrico (400 µl de ácido sulfúrico 30 mM a 400 µl de sobrenadante para uma concentração final de 15 mM de ácido sulfúrico, que igualou a concentração da solução da fase móvel). As células foram  
20 removidas pela centrifugação e filtração antes de carregar.

Os níveis de Farneseno produzidos foram quantificados pela GC-FID. Em cada ponto de tempo, 100 µl de cobertura de oleato de metila foram tomados e diluídos 1:40 em acetato de etila contendo 0,001 % de trans-beta cariofileno. A mistura foi mais uma vez diluída 1:100 em acetato de etila  
25 para uma diluição final de 1:4000, que se ajusta dentro da curva de calibração para o método. Quando nenhum oleato de metila foi usado para a captura de produto, 25 µl de caldo de cultura foram combinados com 975 µl de metanol, a mistura foi turbilhonada por cinco minutos e centrifugada e finalmente diluída 1:100 em acetato de etila contendo 0,001 % de trans-beta cariofileno

antes da análise.

Como mostrado na Figura 9E, na presença de oleato de metila a cepa Y677 atingiu um título de Farneseno de pico de 30 g/L e na ausência de oleato de metila o mesmo atingiu um título de Farneseno de pico de 40 g/L.

#### Exemplo 9

Este exemplo descreve a produção de amorfa-4,11-dieno e Farneseno pelas células hospedeiras em fermentação restrita de oxigênio.

As culturas de semente de Y283 e Y352 foram preparadas e usadas para inocular biorreatores contendo 800 ml de meio de batelada (Tabela 15) e 100 ml de oleato de metila como descrito no Exemplo 3.

Tabela 15 – Meio de Biorreator

| Componente                                            | Meio de<br>semeadura | Meio de batelada |
|-------------------------------------------------------|----------------------|------------------|
| glicose (g/L)                                         | 20                   | 30               |
| galactose (g/L)                                       | 0                    | 5                |
| metionina (g/L)                                       | 0                    | 0,25             |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g/L) | 15                   | 15               |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)                 | 8                    | 8                |
| MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O (g/L)            | 6,15                 | 6,15             |
| Solução de vitamina de levedura (ml/L) (Tabela 9)     | 12                   | 12               |
| Solução de metal traço de levedura (ml/L) (Tabela 9)  | 10                   | 10               |
| Succinato (0,5 M, pH 5,0) (ml/L) (Tabela 7)           | 100                  | 0                |

As Fermentações foram realizadas em Biostat B plus twins Sartorius de 2 L com controladores da quantidade de fluxo de gás. O pH foi controlado automaticamente no pH 5,0 com a adição de NH<sub>4</sub>OH 15 N e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 N. A temperatura foi mantida a 30° C e anti-espumante marca Biospumex 200 K foi usado para controlar a espuma. Os biorreatores foram inoculados entre OD<sub>500</sub> de 0,6 a 1 e deixado cultivar em 30 g/L de glicose.

O gás de desprendimento do biorreator foi levado através de um condensador para medir a taxa de captação de oxigênio (OUR) e geração de CO<sub>2</sub> (CER) usando um espectrômetro de massa de gás de desprendimento. A concentração de oxigênio dissolvido (DO) foi medida usando uma sonda

sensora de O<sub>2</sub> (Hamilton, OXIFERM FDA 225, Hamilton Company, Reno, NV) com sensibilidade entre 10 ppb até a saturação.

Durante a fase inicial da fermentação, a cultura de biorreator converteu a glicose no meio de batelada em biomassa e etanol. Quando a

5 glicose foi consumida (8 a 14 horas depois do início da fermentação dependendo da disponibilidade de oxigênio na cultura) a repressão da glicose do mecanismo de transporte e transcrição de galactose foi aliviado e a expressão de gene de promotores GAL foi induzida pela galactose no meio de batelada. A cultura por batelada continuou o crescimento até que o etanol  
10 produzido no estágio fermentativo estivesse esgotada, ponto no qual um pico de DO marcou o final do período de cultivo.

Para o processo aeróbico, ar seco limpo foi espargido no meio a uma taxa de 1 LPM. A taxa de agitação foi inicialmente ajustada a 400 rpm e uma alça de controle de retroalimentação de DO e programa de cascata de  
15 agitação foram usados para manter a concentração de DO em 40 % (Tabela 16).

Para os processos micro-aeróbicos, o fluxo de gás foi reduzido para 0,25 LPM para minimizar a diluição de gases que atingem o analisador de gás de desprendimento e para aumentar a sensibilidade do espectrômetro  
20 de massa. A taxa de liberação de oxigênio foi variada pelo uso de diferentes razões de fluxo de gás de ar para nitrogênio (Tabela 16).

Para o processo anaeróbico estrito, 100 % de gás nitrogênio foi espargido no meio aquoso a 0,25 LPM antes da inoculação e uma taxa de agitação constante de 400 rpm foi mantida por todo o cultivo (Tabela 16).

25 Tabela 16 – Parâmetros de processo para as fermentações da cepa Y283

| Processo      | Condições  | Parâmetros Controlados                                                                    | Composição do Fluxo de Gás            |
|---------------|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| Aeróbico      | 40 % de DO | Partindo de 400 rpm<br>Controle de retroalimentação de DO com taxa de agitação em cascata | 100 % de ar (21 % de O <sub>2</sub> ) |
|               |            |                                                                                           | 100 % de ar, 0 % de N <sub>2</sub>    |
|               |            |                                                                                           | 90 % de ar, 10 % de N <sub>2</sub>    |
| Microaeróbico | 0 % de DO  | nenhum controle de                                                                        | 80 % de ar, 20 % de N <sub>2</sub>    |

|            |                     |                                    |                        |
|------------|---------------------|------------------------------------|------------------------|
|            |                     | retroalimentação de DO             | 65 % de ar, 35 % de N2 |
|            |                     | taxa de agitação fixada em 400 rpm | 50 % de ar, 50 % de N2 |
|            |                     |                                    | 50 % de ar, 50 % de N2 |
|            |                     |                                    | 35 % de ar, 65 % de N2 |
|            |                     |                                    | 20 % de ar, 80 % de N2 |
| Anaeróbico | Nenhum ar fornecido | Taxa de agitação fixada em 400 rpm | 0 % de ar, 100 % de N2 |

As densidades de célula e o consumo de etanol foram monitorados pela amostragem duas vezes ao dia. Em cada ponto de tempo, 1 ml de amostras de caldo foi coletado e diluído 1:100 em água e a densidade de célula foi medida usando um espectrofotômetro ajustado a 600 nm de comprimento de onda.

Os níveis de etanol e Farneseno produzidos foram quantificados como descrito no Exemplo 8 exceto que a amostra de oleato de metila foi diluída em acetato de etila até uma diluição 1:400 final ao invés de diluição 1:4000.

A Figura 10A mostra as concentrações de DO nas várias fermentações da cepa hospedeira Y283. Como mostrado nas Figuras 10B e 10C, na cepa Y283 a disponibilidade de oxigênio aumentada na cultura levou ao crescimento de célula aumentado, taxa aumentada de conversão de glicose para etanol e taxa aumentada de depleção de etanol do meio. Embora o crescimento, formação de produto e consumo de etanol pela cepa Y283 foram maiores nas culturas totalmente aeradas (DO de 40 %), elas atingiram o platô depois de 24 horas. Como mostrado na Tabela 17, a taxa de consumo de etanol por célula para todos os processos microaeróbicas foi entre 0,40 e 0,72 g de etanol/g de DCW/dia. Como mostrado na Figura 10D, o melhor rendimento de amorfa-4,11-dieno em relação à entrada de carbono foi observado a 80 % de ar e 20 % de Nitrogênio.

PÁGINA INTENCIONALMENTE DEIXADA EM BRANCO

Tabela 17 - Taxa de utilização de etanol específica (EUR) para fermentações microaeróbicas

| Razão de Gás | EUR de Y283<br>(g de etanol / g de DCW / dia) | EUR de Y352<br>(g de etanol / g de DCW / dia) |
|--------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|
|--------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|

|                                                                                                         |      |      |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|------|
| 100 % de N2                                                                                             | 0,42 |      |
| 80 % de N2                                                                                              | 0,40 |      |
| 65 % de N2                                                                                              | 0,42 | 0,42 |
| 50 % de N2                                                                                              | 0,65 | 0,69 |
| 50 % de N2                                                                                              | 0,58 |      |
| 35 % de N2                                                                                              | 0,54 |      |
| 20 % de N2                                                                                              | 0,57 |      |
| 10 % de N2                                                                                              | 0,60 |      |
| 0 % de N2                                                                                               | 0,72 | 0,88 |
| EUR foi calculado a partir do etanol medido no pico para o etanol medido mais baixo para a fermentação. |      |      |

Como mostrado nas Figuras 10E e 10F, na cepa Y352 a disponibilidade de oxigênio aumentado na cultura leva ao crescimento de célula aumentado, taxa aumentada de conversão de glicose para etanol e taxa aumentada de depleção de etanol do meio. Como mostrado na Tabela 17, a taxa de consumo de etanol por célula para os dois processos microaeróbicos testados foi entre 0,42 e 0,88 g de etanol/g de DCW/dia. Como mostrado na Figura 10G, embora rendimento levemente mais alto de Farneseno na entrada de carbono foi observado a 100 % de ar, a produção continuou em um período de tempo mais longo nas culturas microaeróbicas.

#### 10 Exemplo 10

Este exemplo descreve a produção de amorfa-4,11-dieno pelas células hospedeiras em culturas de frasco agitado com restrição de carbono e fosfato.

Uma solução de estoque de enzima de amiloglicosidase (glicoamilase) foi preparada dissolvendo-se amiloglicosidase sólida (Sigma A7420-100MG) em tampão de succinato 0,5 M (pH 5,0) para uma concentração de enzima final de 100 U/ml e esterilizando por filtração a solução.

Uma cultura de semente de Y337 foi preparada pela inoculação de 1 ml de células Y337 congeladas em um frasco de 250 ml com defletor contendo 50 ml de meio de semeadura restrito em fosfato (Tabela 18). A cultura de semente foi cultivada durante a noite a 30° C e 200 rpm.

Tabela 18 – Meio de Cultura em frasco agitado restrito em fosfato

| Componente | Meio de | Meio de Produção (ml/L) |
|------------|---------|-------------------------|
|------------|---------|-------------------------|

|                                                                                                                                                                                    | semeadura (ml/L) |                                        |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|----------------------------------------|
| Água de torneira                                                                                                                                                                   | 350              | 250                                    |
| 2X base de batelada <sup>a)</sup>                                                                                                                                                  | 500              | 500 (nenhum $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) |
| Solução de vitamina de levedura (Tabela 9)                                                                                                                                         | 12               | 12                                     |
| Solução de metal traço de levedura (Tabela 9)                                                                                                                                      | 10               | 10                                     |
| succinato (0,5 M, pH 5,0) (Tabela 7)                                                                                                                                               | 100              | 100                                    |
| glicose- $\text{H}_2\text{O}$ (715 g/L) (Tabela 7)                                                                                                                                 | 30               | 0                                      |
| Maltrin M-150 (500 g/L)                                                                                                                                                            | 0                | 100                                    |
| Galactose (250 g/L)                                                                                                                                                                | 0                | 20                                     |
| Metionina (25 g/L)                                                                                                                                                                 | 0                | 10                                     |
| a) 1 g/L de $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 30 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 12,3 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (nota: nenhum aquecimento durante a mistura) |                  |                                        |

A cultura de semente de Y337 foi usada para inocular diversos frascos agitados de 250 ml com defletor a uma  $\text{OD}_D$  de partida de 0,05. Os frascos de produção contiveram 40 ml de meio de produção restritos em fosfato (Tabela 18).  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  foi adicionado a cada frasco a partir de uma solução de estoque de 100 g/L esterilizada por filtração até concentrações finais de 0,1, 0,25, 0,5, 0,8, 2 e 8 g/L. Antes da inoculação, 80  $\mu\text{l}$  de solução de estoque esterilizada por filtração recém descongelada de amiloglicosidase a 100 U/ml foram adicionados a cada frasco (concentração final de 0,2 U/ml). Os frascos de produção foram incubados a 30° C e 200 rpm por até 3 dias. Durante o curso do período de cultura, a glicose foi liberada pela glicoamilase na taxa constante de aproximadamente 20 mg/hora.

Os títulos de amorfa-4,11-dieno foram determinados transferindo-se 2 a 10  $\mu\text{l}$  da cobertura de oleato de metila para um frasco de vidro limpo contendo 500  $\mu\text{l}$  de acetato de etila reforçado com beta- ou trans-cariofileno como um padrão interno e analisando as amostras de acetato de etila como descrito no Exemplo 4.

Como mostrado na Figura 11, os títulos de amorfa-4,11-dieno globais foram comparáveis em todas as concentrações de fosfato testadas exceto a mais baixa (0,1 g/L), mas o crescimento da célula foi limitado nas concentrações de fosfato mais baixas, traduzindo em produção por célula

aumentada de amorfa-4,11-dieno nas concentrações de fosfato mais baixas.

### Exemplo 11

Este exemplo descreve a produção de amorfa-4,11-dieno pelas células hospedeiras na fermentação de lote alimentado, restrita em carbono com restrição de fosfato e uma alimentação de glicose.

As culturas de semente Y337 foram preparadas e usadas para inocular biorreatores contendo meio de batelada restrito em fosfato (Tabela 19) como descrito no Exemplo 3. As fermentações foram realizadas e as amostras foram analisadas, essencialmente como descrito no Exemplo 4 com as seguintes modificações.

A cultura de biorreator foi deixada crescer até que a glicose no meio de batelada estivesse esgotada, ponto no qual, uma alimentação exponencial foi iniciada para o que meio de alimentação de glicose restrito em fosfato (Tabela 19) foi bombeado para dentro dos biorreatores na taxa definida pelas seguintes equações:

$$F = V\mu_{set}S_B e^{\mu_{set}(t-t_0)}$$

$$V = V_0 + V_{\text{Alimentação}}$$

F é a taxa de fluxo de massa de substrato (g/h), V é o volume de líquido no biorreator em um dado tempo (L),  $S_B$  é a concentração de substrato no meio de batelada (19,5 g/L),  $\mu_{set}$  é a taxa de alimentação específica ( $0,087 \text{ h}^{-1}$ ) t é a idade do lote (h),  $t_0$  é a idade do lote quando a alimentação foi iniciada (h),  $V_0$  é o volume inicial no biorreator e  $V_{\text{feed}}$  é o volume total de alimentação adicionado ao biorreator em um dado tempo (L). A alimentação exponencial continuou até que a razão de F/V atingiu uma taxa de alimentação pré-ajustada máxima (Tabela 20). Depois de atingir esta taxa de alimentação máxima, a razão de F/V foi mantida constante durante o resto do processo a uma taxa de alimentação pré-ajustada estacionária. Entretanto, porque o volume (V) continuasse a aumentar conforme mais alimentação foi

adicionada ao biorreator, a taxa de fluxo de massa de substrato (F) continuou a aumentar até que o volume atingiu o volume de trabalho máximo do biorreator (aproximadamente 3 vezes o volume de partida). Durante o resto do processo, o volume do biorreator foi mantido constante pela remoção do caldo de célula continuamente do reator e a taxa de fluxo de massa de substrato (F) foi mantida constante. A Figura 12A mostra o perfil da taxa de alimentação de glicose da fermentação.

Tabela 19 – Meio de biorreator restrito em fosfato

| Componente                                            | Meio de Semeadura <sup>a)</sup> | Meio de Batelada <sup>b)</sup> | Meio de Alimentação de Glicose <sup>c)</sup> | Meio de Alimentação Misto <sup>d)</sup> |
|-------------------------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------------|
| glicose (g/L)                                         | 20                              | 19,5                           | 578                                          | 425                                     |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g/L) | 15                              | 15                             | 0                                            | 0                                       |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)                 | 1                               | Ver as Tabelas 20 e 21         | Ver a Tabela 20                              | Ver a Tabela 21                         |
| MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O (g/L)            | 6,15                            | 6,15                           | 5,12                                         | 5,12                                    |
| K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g/L)                  | 0                               | 0                              | 3,5                                          | 3,5                                     |
| Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g/L)                 | 0                               | 0                              | 0,28                                         | 0,28                                    |
| Solução de vitamina de levedura (ml/L) (Tabela 9)     | 12                              | 12                             | 12                                           | 12                                      |
| Solução de metal traço de levedura (ml/L) (Tabela 9)  | 10                              | 10                             | 10                                           | 10                                      |
| Succinato (0,5 M, pH 5,0) (ml/L) (Tabela 7)           | 100                             | 0                              | 0                                            | 0                                       |
| 95 % (v/v) etanol (ml/L)                              | 0                               | 0                              | 0                                            | 237                                     |

A produção de amorfa-4,11-dieno foi induzida em uma OD<sub>600</sub> de aproximadamente 50.

Como mostrado na Tabela 20 e Figura 12B, fornecendo 8 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> no meio de batelada e nenhum fosfato no meio de alimentação mostrou a melhor produção de amorfa-4,11-dieno a 5,52 g/L. Sob estas condições, o fosfato no meio de batelada foi consumido em 40 horas e o crescimento de célula foi consequentemente restrito (isto é, menos carbono foi para a biomassa e mais carbono foi para a produção de amorfa-4,11-dieno) (Figura 12C).

Tabela 20 - Produção de amorfa-4,11-dieno pela cepa Y337 com alimentações de glicose e restrição de fosfato

| Lote | Alimentação | Taxa de | Tempo para o | Máxima | Título Máximo |
|------|-------------|---------|--------------|--------|---------------|
|------|-------------|---------|--------------|--------|---------------|

| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>(g/L) | de<br>KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>(g/L) | alimentação<br>máxima<br>(g/h/L) <sup>a)</sup> | Taxa<br>alimentação<br>estacionária<br>(g/h/L) <sup>a)</sup> | título Máx (h) | OD  | (g/L) |
|------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|----------------|-----|-------|
| 8                                        | 9                                              | 10                                             | 10                                                           | 114,86         | 360 | 2     |
| 8                                        | 4,5                                            | 10                                             | 10                                                           | 95,62          | 307 | 1,92  |
| 8                                        | 0                                              | 10                                             | 10                                                           | 95,66          | 231 | 5,52  |
| 6                                        | 0                                              | 10                                             | 10                                                           | 78,30          | 246 | 4,2   |
| 6                                        | 2                                              | 10                                             | 10                                                           | 88,98          | 307 | 4,36  |
| 6                                        | 2                                              | 10                                             | 10                                                           | 89,21          | 263 | 3,91  |
| 6                                        | 2                                              | 10                                             | 5                                                            | 119,73         | 274 | 2,98  |

a) g/h/L é g de substrato/ h/ L de volume de biorreator.

### Exemplo 12

Este exemplo descreve a produção de amorfa-4,11-dieno pelas células hospedeiras na fermentação de lote alimentado, restrito em carbono com restrição de fosfato e uma alimentação de glicose/etanol misto.

5 As cultura de semente Y337 foram preparadas e usadas para inocular biorreatores contendo meio de batelada restrito em fosfato (Tabela 19) como descrito no Exemplo 3. As fermentações foram realizadas e as amostras foram analisadas, essencialmente como descrito no Exemplo 4 com as seguintes modificações.

10 Durante a fase inicial da fermentação, um pouco da glicose no meio de batelada foi convertida para etanol. A cultura de biorreator foi deixada crescer até que a glicose e o etanol no meio de batelada estivessem esgotados, ponto no qual, uma alimentação exponencial foi iniciada para o que meio de alimentação misto restrito em fosfato (Tabela 19) foi bombeado

15 no biorreator na taxa definida pelas seguintes equações:

$$F = V\mu_{set}S_B e^{\mu_{set}(t-t_0)}$$

$$V = V_0 + V_{Alimentação}$$

F é a taxa de fluxo de massa de substrato (g/h), V é o volume líquido no biorreator em um dado tempo (L), S<sub>B</sub> é a concentração de substrato no meio de batelada (20 g/L),  $\mu_{set}$  é a taxa de alimentação específica (0,087 h<sup>-1</sup>), t é a idade do lote (h), t<sub>0</sub> é a idade do lote quando a alimentação foi iniciada

20 (h), V<sub>0</sub> é o volume inicial no biorreator e V é o volume total de alimentação

adicionada ao biorreator em um dado tempo (L). A fase de alimentação exponencial continuou até que a razão de F/V atingiu uma taxa de alimentação pré-ajustada máxima em unidades de g de substrato/ h/ L de volume de biorreator (Tabela 21). Depois de atingir este máximo, a razão de F/V foi mantida constante durante o resto do processo a uma taxa de alimentação pré-ajustada estacionária (Tabela 21).

A produção de amorfa-4,11-dieno foi induzida a uma OD<sub>600</sub> de aproximadamente 50.

Como mostrado na Tabela 21 e Figura 13A, fornecendo 8 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> no meio de batelada e 0 a 0,5 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> no meio de alimentação mostrou a melhor produção de amorfa-4,11-dieno acima de 26 a 27 g/L. Sob estas condições, o fosfato no meio de batelada foi consumido em 40 horas e o crescimento de célula foi consequentemente restrito (isto é, menos carbono foi para a biomassa e mais carbono foi para a produção de amorfa-4,11-dieno) (Figura 13B). Comparado a 0 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> no meio de alimentação, 0,5 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> no meio de alimentação deixou o crescimento de célula e a produção de amorfa-4,11-dieno continuar por um adicional de 24 horas.

Tabela 21 - Produção de amorfa-4,11-dieno pela cepa Y337 com alimentações mistas e restrição de fosfato

| Lote de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L) | Alimentação KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L) | Taxa de Alimentação Máxima (g/h/L) <sup>a)</sup> | Taxa de Alimentação Estacionária (g/h/L) <sup>a)</sup> | Tempo para Título Máximo (h) | OD Máxima | Título Máximo (g/L) |
|-----------------------------------------------|---------------------------------------------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|------------------------------|-----------|---------------------|
| 8                                             | 9                                                 | 8,6                                              | 8,6                                                    | 118,17                       | 329       | 12,69               |
| 8                                             | 9                                                 | 8,6                                              | 4,3                                                    | 94,85                        | 205       | 10,31               |
| 8                                             | 0                                                 | 8,6                                              | 8,6                                                    | 96,83                        | 201       | 27,36               |
| 4                                             | 0                                                 | 8,6                                              | 8,6                                                    | 67,17                        | 168       | 9,68                |
| 8                                             | 0                                                 | 8,6                                              | 4,3                                                    | 120,20                       | 209       | 16,27               |
| 4                                             | 0                                                 | 8,6                                              | 4,3                                                    | 120,20                       | 181       | 17,94               |
| 8                                             | 0                                                 | 8,6                                              | 8,6                                                    | 95,93                        | 212       | 18,07               |
| 8                                             | 0,5                                               | 8,6                                              | 8,6                                                    | 120,33                       | 209       | 26,23               |
| 8                                             | 0                                                 | 10                                               | 10                                                     | 96,13                        | 213       | 14,55               |
| 8                                             | 0,5                                               | 10                                               | 10; caiu para 2,5 em 67 h                              | 145,16                       | 204       | 18,38               |
| 8                                             | 1                                                 | 10                                               | 10                                                     | 97,69                        | 287       | 13,15               |

a) g/h/L é g de substrato/ h/ L de volume de biorreator.

### Exemplo 13

Este exemplo descreve métodos para gerar cepas hospedeiras de *Escherichia coli* que abrigam sequências de nucleotídeo heterólogas que codificam enzimas incluindo enzimas do caminho MEV e terpeno sintases integradas em seus genomas.

As integrações genômicas foram realizadas usando uma variação do procedimento resumido por Datsenko & Wanner ((2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 6640-6645). O método utiliza plasmídeos que compreendem um cassete de promotor T7-gene de interesse-FRT-Kan-FRT. O cassete é flanqueado em cada lado por aproximadamente 100 nucleotídeos que são homólogos às regiões que flanqueiam o local genômico alvejado para a integração do cassete. As regiões flanqueadoras são criadas pela amplificação pela PCR do cassete usando iniciadores que compreendem um trecho de aproximadamente 30 nucleotídeos que é homólogo à extremidade 3' ou 5' do cassete e um outro trecho de aproximadamente 50 nucleotídeos que é homólogo à região que flanqueia o local genômico (Figura 14). O produto de PCR resultante é usado como o padrão em uma 2ª reação de PCR que adiciona mais 50 nucleotídeos de homologia com a sequência flanqueadora em cada extremidade do cassete (Figura 14). O cassete com as suas sequências flanqueadoras é eletroporado em células de *Escherichia coli* eletro-competente que carrega um plasmídeo que codifica a proteína Red recombinase. As colônias resistentes à Canamicina ("Kan") são triadas pela PCR de colônia. Os recombinantes positivos são tratados com fago P1 e a integração é transferida a uma cepa fresca via transdução de P1. A cepa resultante é transformada com um plasmídeo que codifica a FLP recombinase, a atividade da qual faz com que o gene Kan seja excisado do cassete, deixando atrás o promotor T7-gene de interesse no local genômico alvejado. A cepa hospedeira final é curada da FLP recombinase.

Aplicando o método descrito, a cepa B 1060 hospedeira foi

gerada pela integração de um fragmento de DNA que codifica uma  $\beta$ -Farneseno sintase ("FS") no operon Lac de *Escherichia coli* cepa B 1021 (MM294(DE3)(T1R)). Para esta finalidade, a cepa MM294 de *Escherichia coli* (ATCC33625) foi feita DE3 usando o kit de lisogenização DE3

5 (Novagen, Darmstadt, Alemanha) e foi feita resistente ao fago T1 cultivando a cepa na presença de fago T1 em excesso, produzindo assim a cepa B1021. Um cassete FRT-Kan-FRT foi inserido usando uma modificação da metodologia QuikChange (Geiser *et al.* (2001) Biotechniques 31: 88-92) no plasmídeo de expressão pAM454, que codifica a  $\beta$ -Farneseno sintase de

10 *Artemisia annua* (Número de acesso no GenBank AY835398), otimizada no códon para a expressão em *Escherichia coli*, sob o controle do promotor T7, produzindo assim o plasmídeo de expressão pAM617. Porque o cassete T7-FS-FRT-Kan-FRT em pAM617 já é flanqueado pelas sequências dos locais mhpR e cynX (SEQ ID NO: 70), apenas uma rodada de amplificação pela

15 PCR foi necessária para criar 100 sequências de nucleotídeo homólogas às sequências de mhpR ou cynX que flanqueiam o operon Lac. As células hospedeiras MM294(DE3) que abrigam o plasmídeo de expressão pAM88 (codifica a Red recombinase) foram cultivadas a 30° C em meio LB contendo 50  $\mu$ g/ml de carbenicilina e 1 mM de arabinose a uma OD<sub>600</sub> de 0,6. As

20 células foram colhidas, tornadas eletro-competentes e transformadas com o produto de PCR. As colônias foram obtidas depois de 2 dias de crescimento a 30° C em LB ágar contendo 50  $\mu$ g/ml de canamicina e o integrante correto foi selecionado pela PCR de colônia. A integração foi transferida para uma cepa hospedeira B1021 (MM294(DE3)(T1R)) via transdução de P1 e a cepa

25 resultante foi feita competente e foi transformada com o plasmídeo de expressão pAM89 (codifica a FLP recombinase). As colônias foram obtidas depois de 2 dias de crescimento a 30° C em LB ágar contendo 50  $\mu$ g/ml de carbenicilina. Uma colônia foi isolada e cultivada a 42° C em meio LB para perder o plasmídeo pAM89, produzindo a cepa B 1060 (MM294(DE3)(T1R))

lac::T7-FS).

A cepa hospedeira B 1061 foi gerada pela integração de um fragmento de DNA que codifica uma mevalonato cinase (“MK”) dentro do operon *ackpta* da cepa B 1021 da *Escherichia coli*. Para esta finalidade, um

5 fragmento de DNA que codifica a mevalonato cinase de *Saccharomyces cerevisiae*, otimizado no códon para a expressão em *Escherichia coli* (SEQ ID NO: 71), foi inserido nos sítios de restrição *NdeI* *BamHI* do plasmídeo pAM618. O plasmídeo pAM618 compreende um promotor T7 seguido por um sítio de clonagem múltiplo (MCS) e um cassete FRT-KanR-FRT (SEQ ID

10 NO: 72, Figura 15). O cassete T7-MK-FRT-Kan-FRT resultante foi colocado através de duas rodadas de amplificação pela PCR como descrito acima para criar 100 sequências flanqueadoras de nucleotídeo homólogas ao operon *ackpta*. O produto de PCR final foi introduzido na cepa B1021 de *Escherichia coli* como descrito acima, produzindo a cepa B1061 (MM294(DE3)(T1R) *ackpta*::T7-MK). A integração também foi transferida para a cepa hospedeira

15 B 1060, produzindo a cepa B 1124 (MM294(DE3)(T1R) *lac*::T7-FS *ackpta*::T7-MK).

A cepa hospedeira B1062 foi gerada pela integração de um fragmento de DNA que codifica uma fosfomevalonato cinase (“PMK”) no

20 local *poxB* da cepa B 1021 de *Escherichia coli*. Para esta finalidade, um fragmento de DNA que codifica a fosfomevalonato cinase de *Saccharomyces cerevisiae*, otimizada no códon para a expressão em *Escherichia coli* (SEQ ID NO: 73), foi inserida nos sítios de restrição *NdeI* *BamHI* do plasmídeo pAM618. O cassete T7-PMK-FRT-Kan-FRT resultante foi colocado através

25 de duas rodadas de amplificação pela PCR como descrito acima para criar 100 sequências flanqueadoras de nucleotídeo homólogas ao local *poxB*. O produto de PCR final foi introduzido na cepa B 1021 de *Escherichia coli* como descrito acima, produzindo a cepa B1062 (MM294(DE3)(T1R) *poxB*::T7-PMK).

A cepa hospedeira B 1273 foi gerada pela integração de um fragmento de DNA que codifica uma HMG-CoA redutase (“HMGR”) no local *IdhA* da cepa B1021 de *Escherichia coli*. Para esta finalidade, um fragmento de DNA que codifica o HMGR de *Staphylococcus aureus* (*mva*;

5 Número de acesso no GenBank BA000017, REGIÃO: 2688925..2687648) foi inserido nos sítios de restrição *EcoRI* *BamHI* do plasmídeo pAM618 depois de tratar o sítio de restrição *EcoRI* com o fragmento Klenow. O cassete de restrição T7-*mvaA*-FRT-Kan-FRT resultante foi colocado através de duas rodadas de amplificação pela PCR como descrito acima para criar 100  
10 sequências flanqueadoras de nucleotídeo homólogas ao local *IdhA*. O produto de PCR final foi introduzido na cepa B1021 de *Escherichia coli* como descrito acima, produzindo a cepa B1273 (MM294(DE3)(T1R) *IdhA*::T7-*mvaA*).

Embora muitos exemplos específicos tenham sido fornecidos,  
15 a descrição acima é intencionada a ilustrar ao invés de limitar as formas de realização aqui fornecidas. Muitas variações das formas de realização tornar-se-ão evidentes àqueles habilitados na técnica na revisão deste relatório descritivo. O escopo das formas de realização, portanto, deve ser determinado não com referência à descrição acima, mas ao invés deve ser determinado  
20 com referência às reivindicações anexas junto com seu escopo completo de equivalentes.

## REIVINDICAÇÕES

1. Método para produzir um composto isoprenóide, caracterizado pelo fato de que compreende:

5 (a) obter células hospedeiras que são capazes de fabricar o composto isoprenóide, em que cada célula hospedeira compreende uma sequência de ácido nucléico heteróloga compreendendo as SEQ ID NOs: 1 a 5;

10 (b) cultivar as células hospedeiras em um meio compreendendo uma fonte de carbono sob condições limitadas de oxigênio, em que a concentração de oxigênio dissolvido no meio está entre 0% e 20%; e

(c) recuperar o composto isoprenóide produzido pelas células hospedeiras do meio, em que as células hospedeiras são células de levedura.

15 2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a fonte de carbono compreende uma fonte de carbono não etanol que é convertida pelas células hospedeiras em etanol.

3. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a fonte de carbono compreende etanol que é exogenamente fornecido ao meio.

20 4. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que as células hospedeiras são mantidas em condições que incluem limitação de oxigênio por entre 4 horas e 12 dias.

5. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as células hospedeiras são *S. cerevisiae*.

25 6. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que a concentração de oxigênio dissolvido no meio está entre 0% e 15%.

7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que a concentração de oxigênio dissolvido no meio é de 0% ou não pode ser detectada.

8. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que o isoprenóide é selecionado do grupo que consiste de um hemiterpeno, monoterpeno, sesquiterpeno, diterpeno, triterpeno, tetraterpeno, e politerpeno.

5                    9. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que o isoprenóide é um isoprenóide C<sub>5</sub>-C<sub>20</sub>.

10                   10. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que o isoprenóide é selecionado do grupo que consiste de abietadieno, amorfadieno, careno,  $\alpha$ -farneseno,  $\beta$ -farneseno, farnesol, geraniol, geranilgeraniol, isopreno, linalool, limoneno, mirceno, nerolidol, ocimeno, patchoulol,  $\beta$ -pineno, sabineno,  $\gamma$ -terpineno, terpinoleno e valenceno.

Figura 1

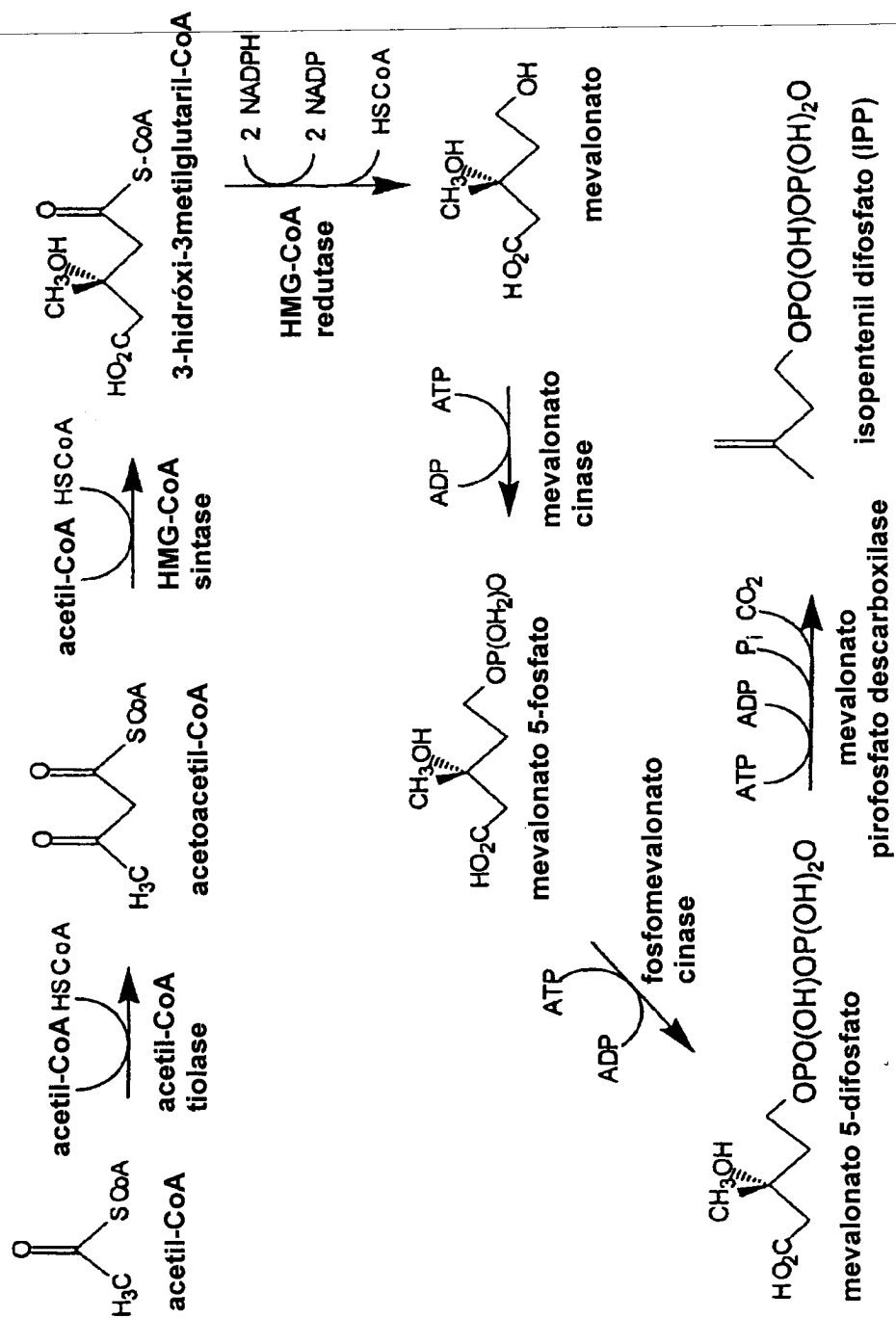


Figura 2

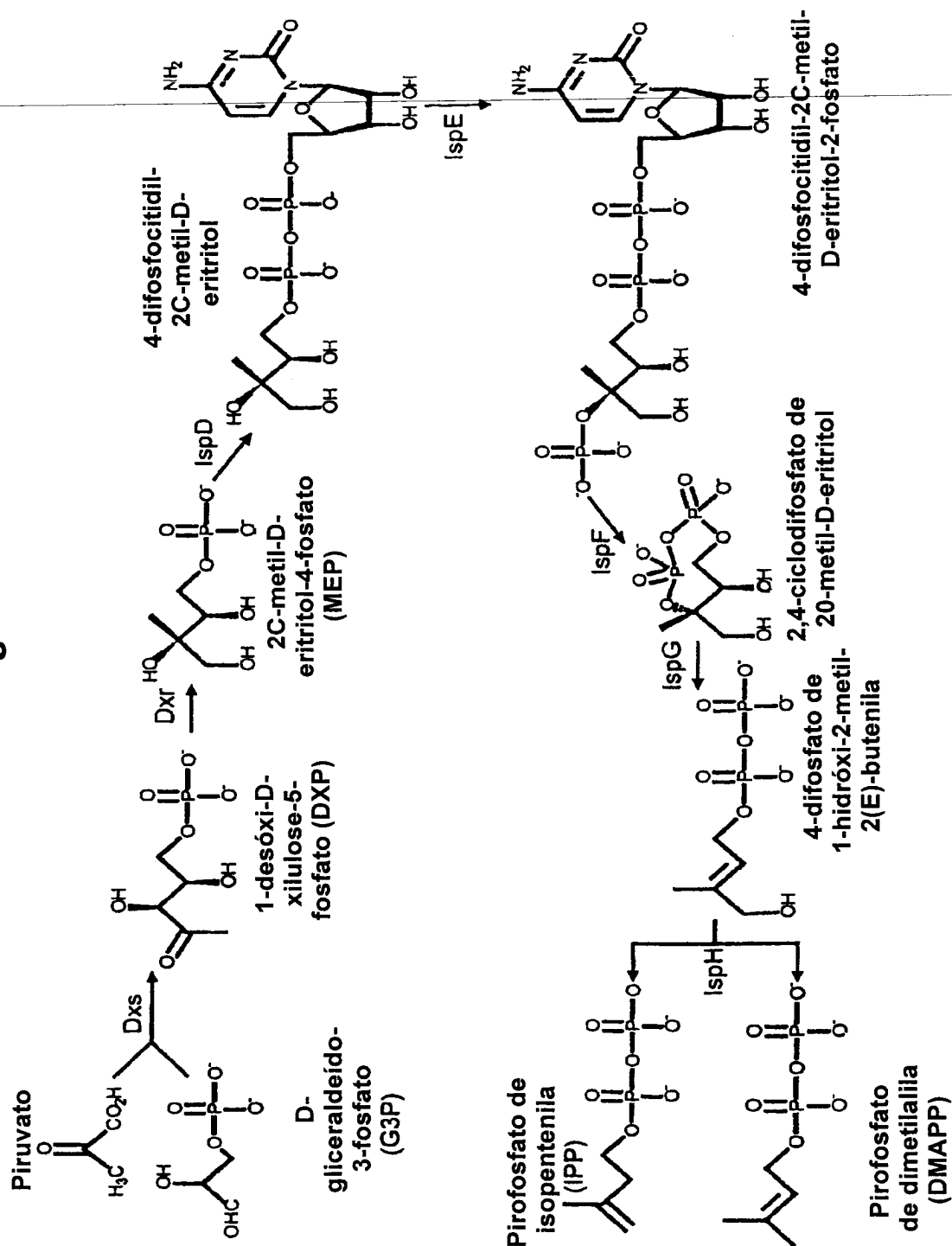


Figura 3

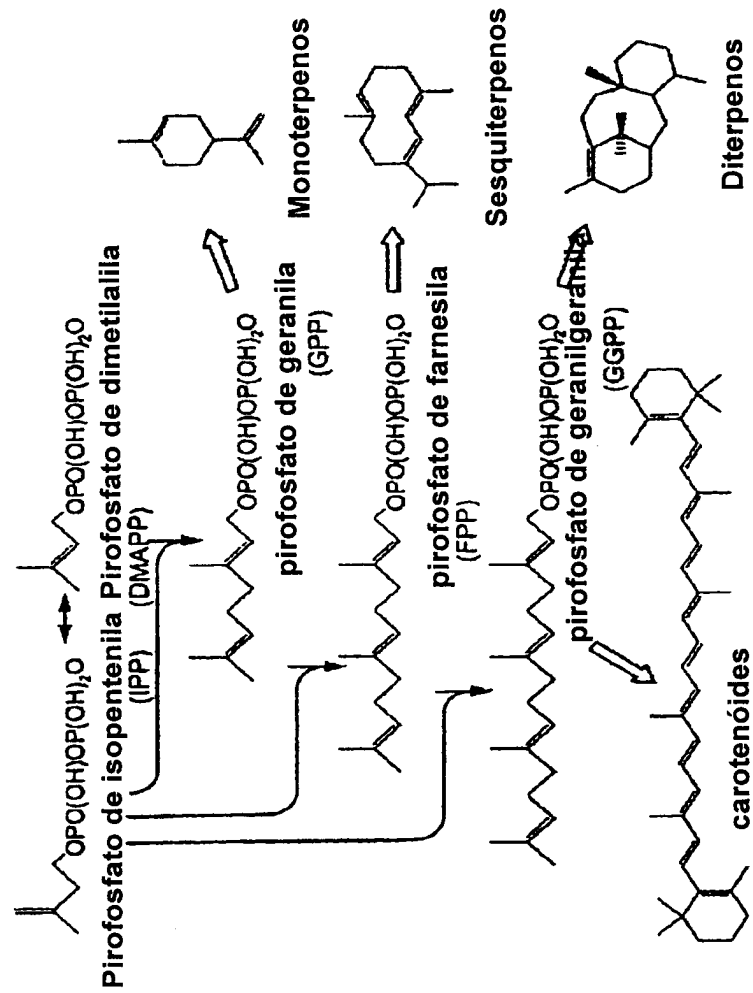


Figura 4

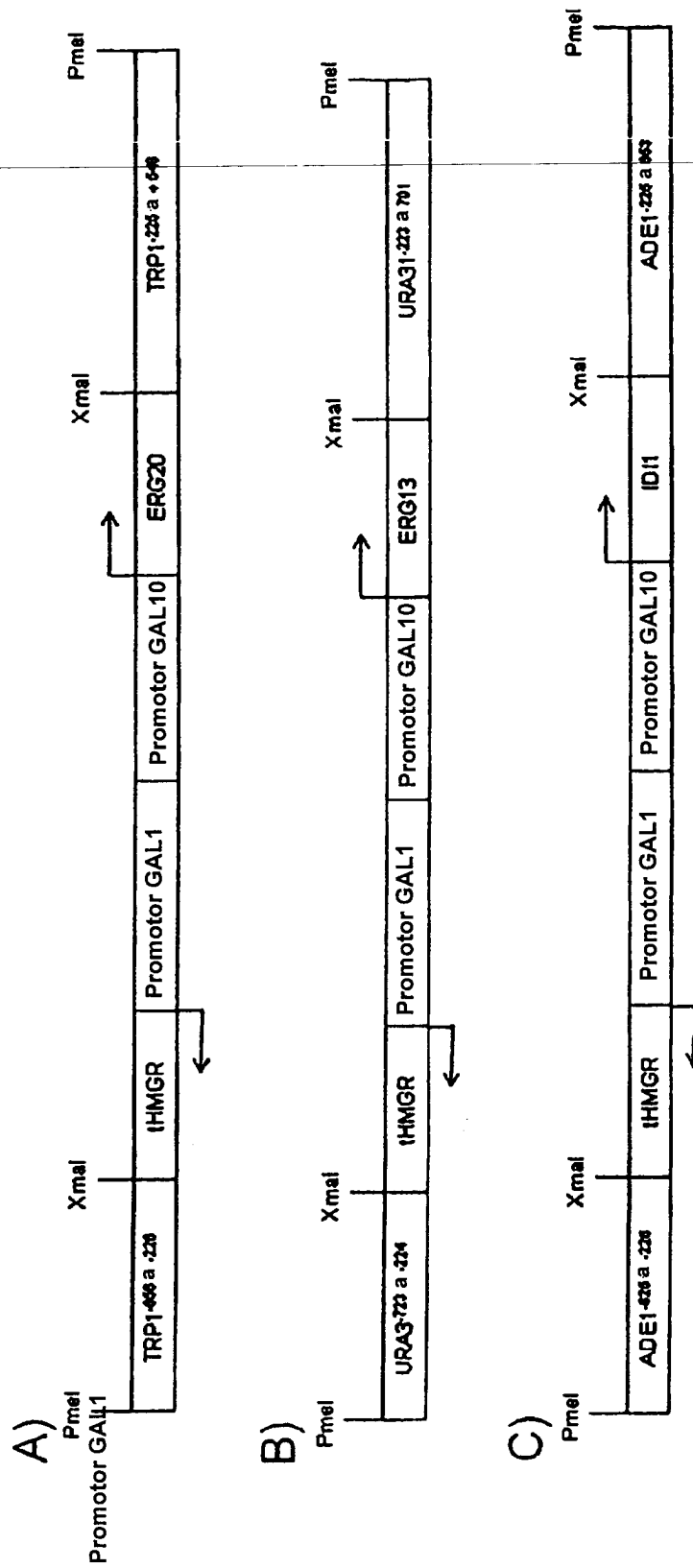


Figura 4 (Continuação)

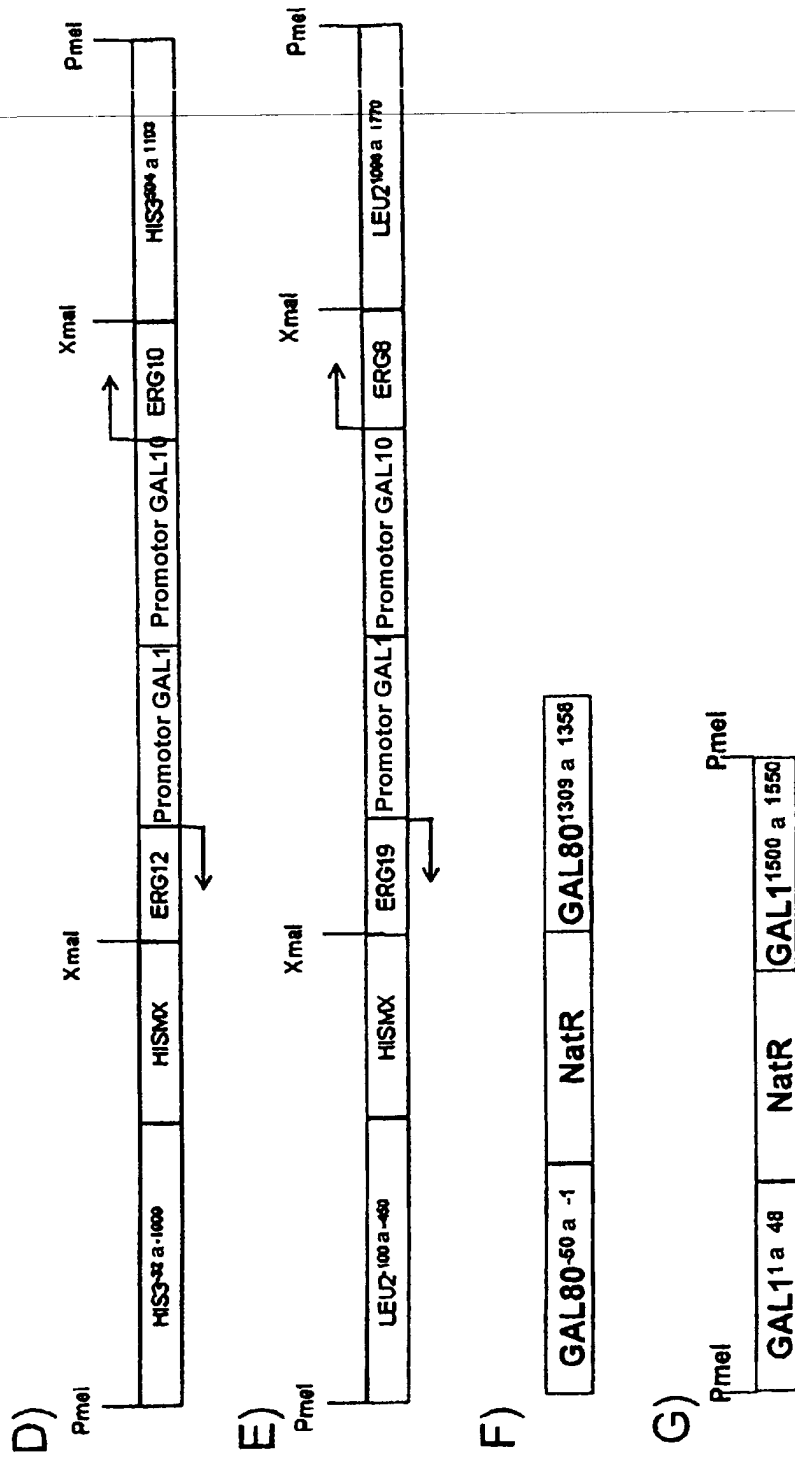


Figura 5

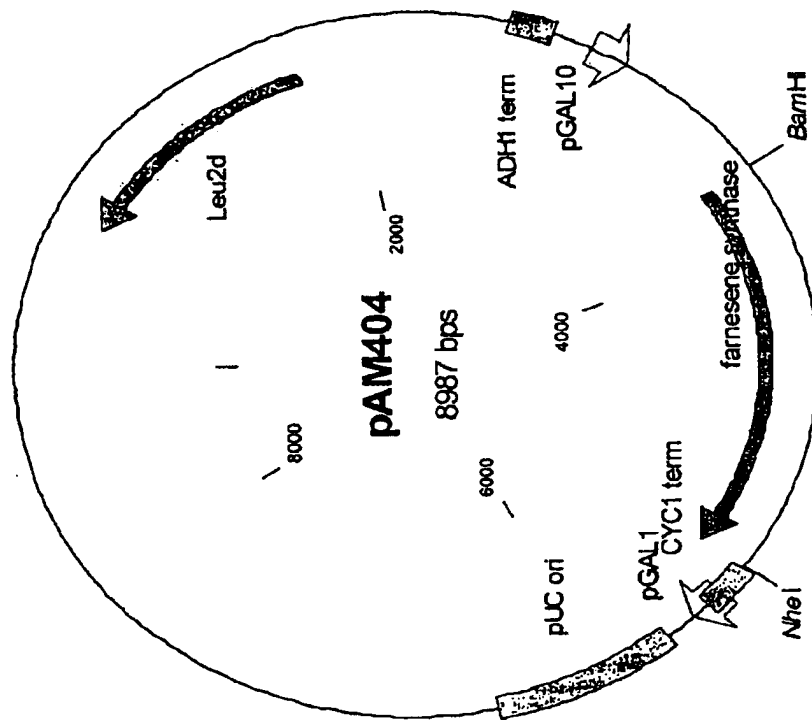


Figura 6

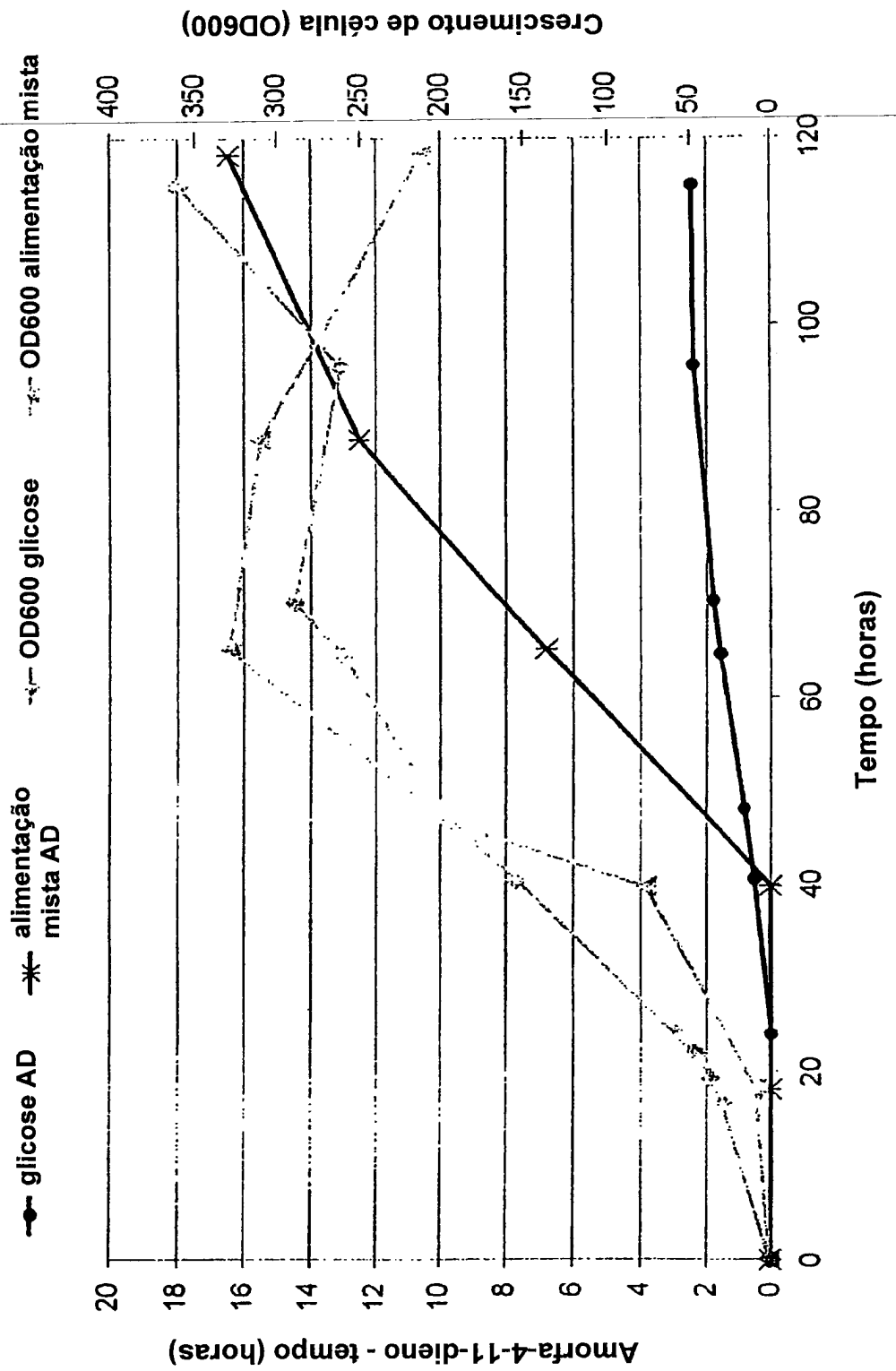


Figura 7A

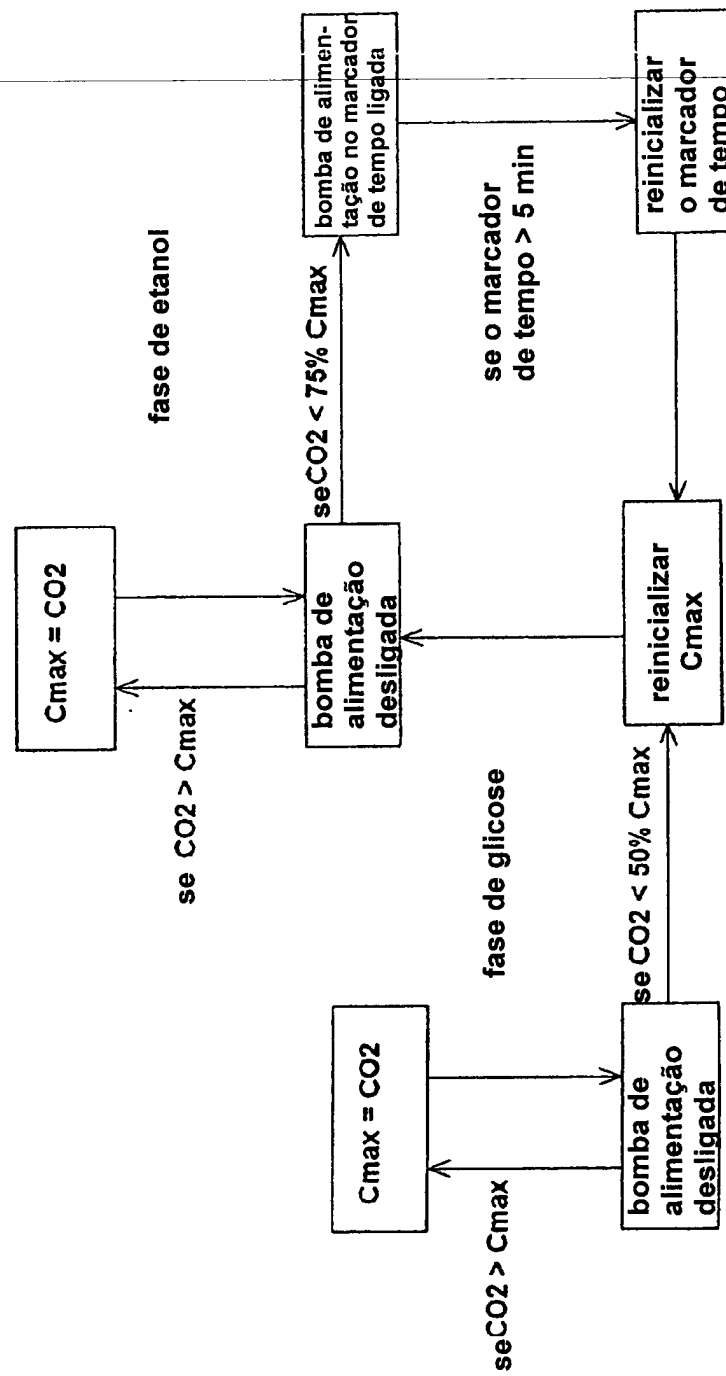


Figura 7B

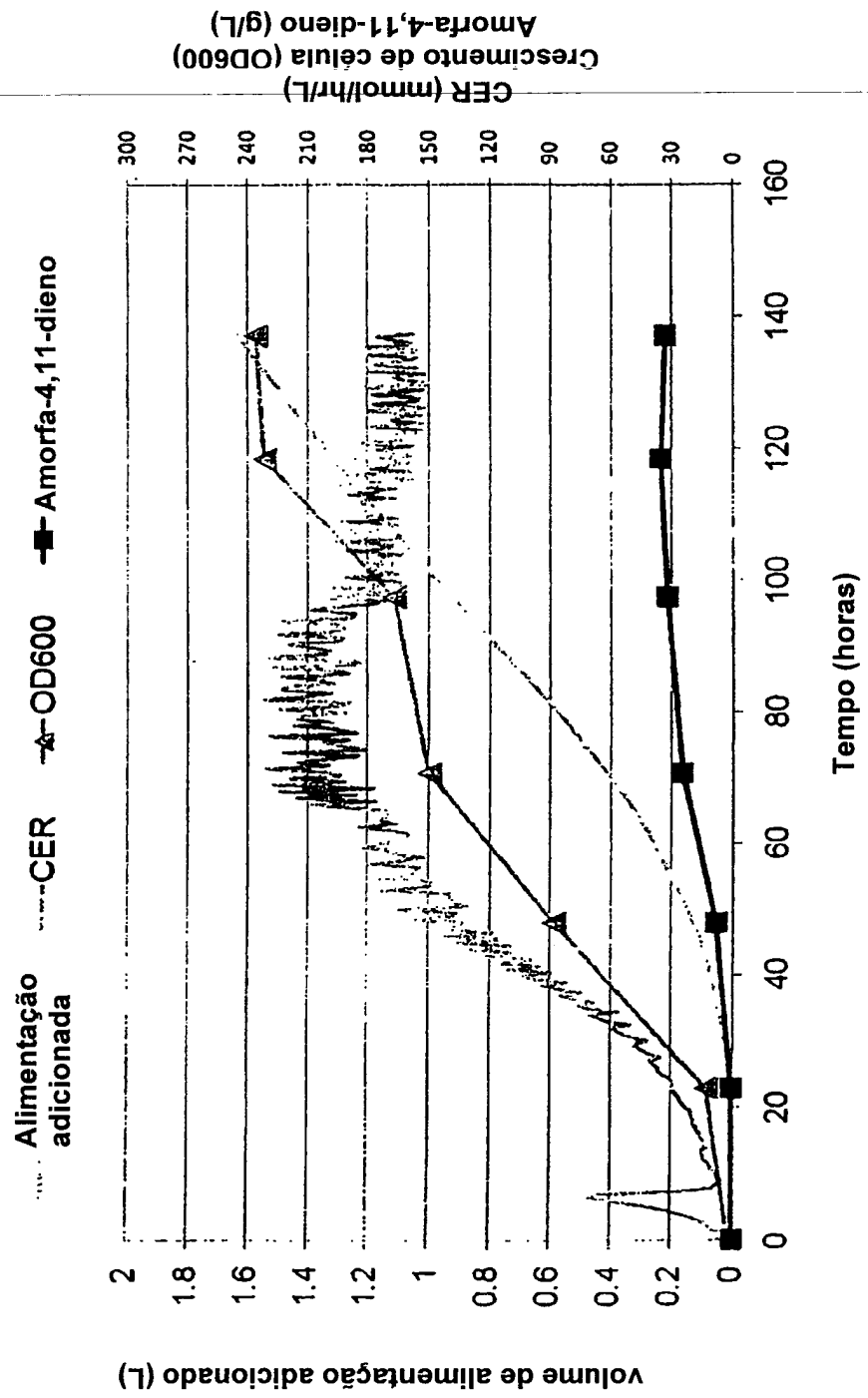


Figura 8

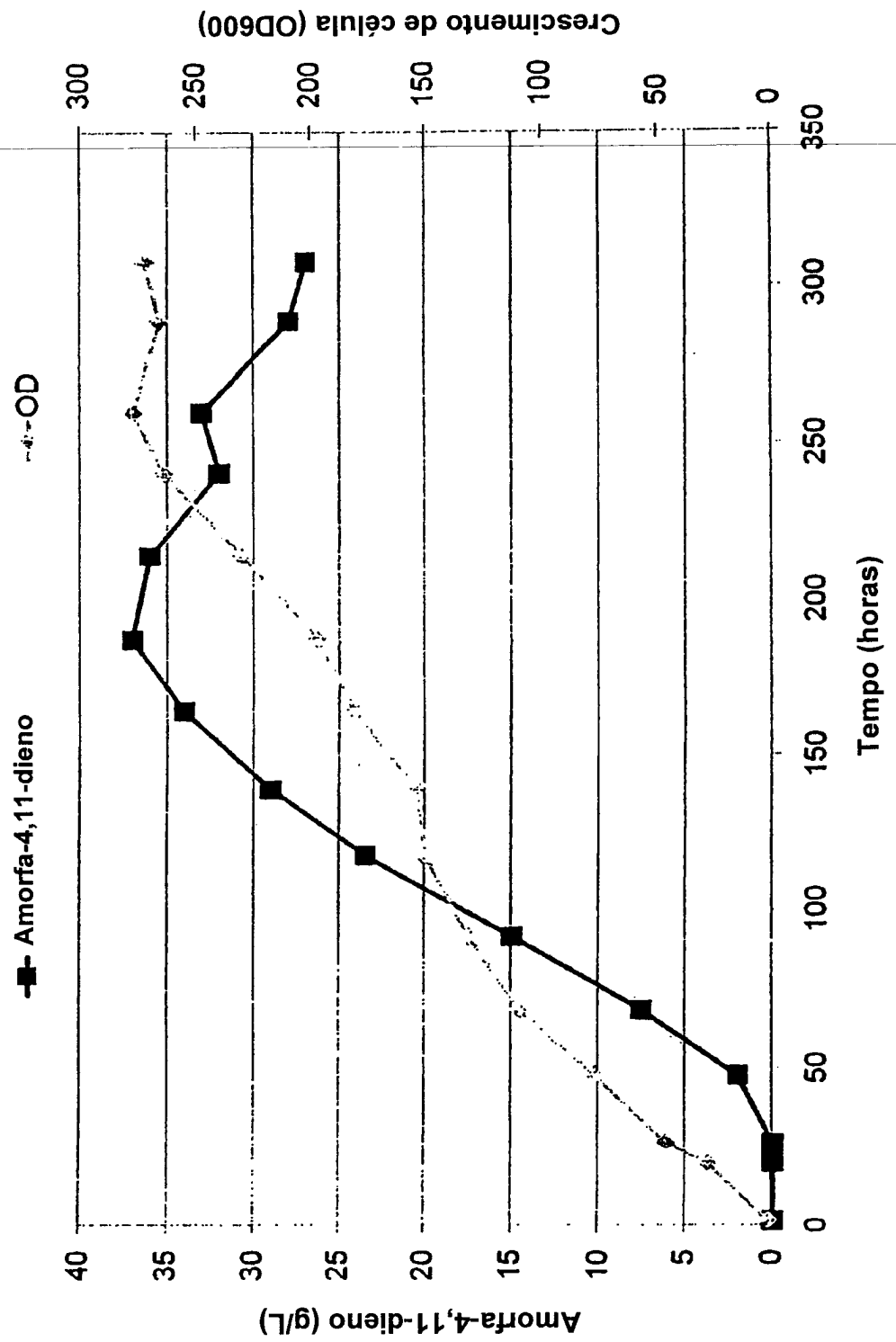


Figura 9A

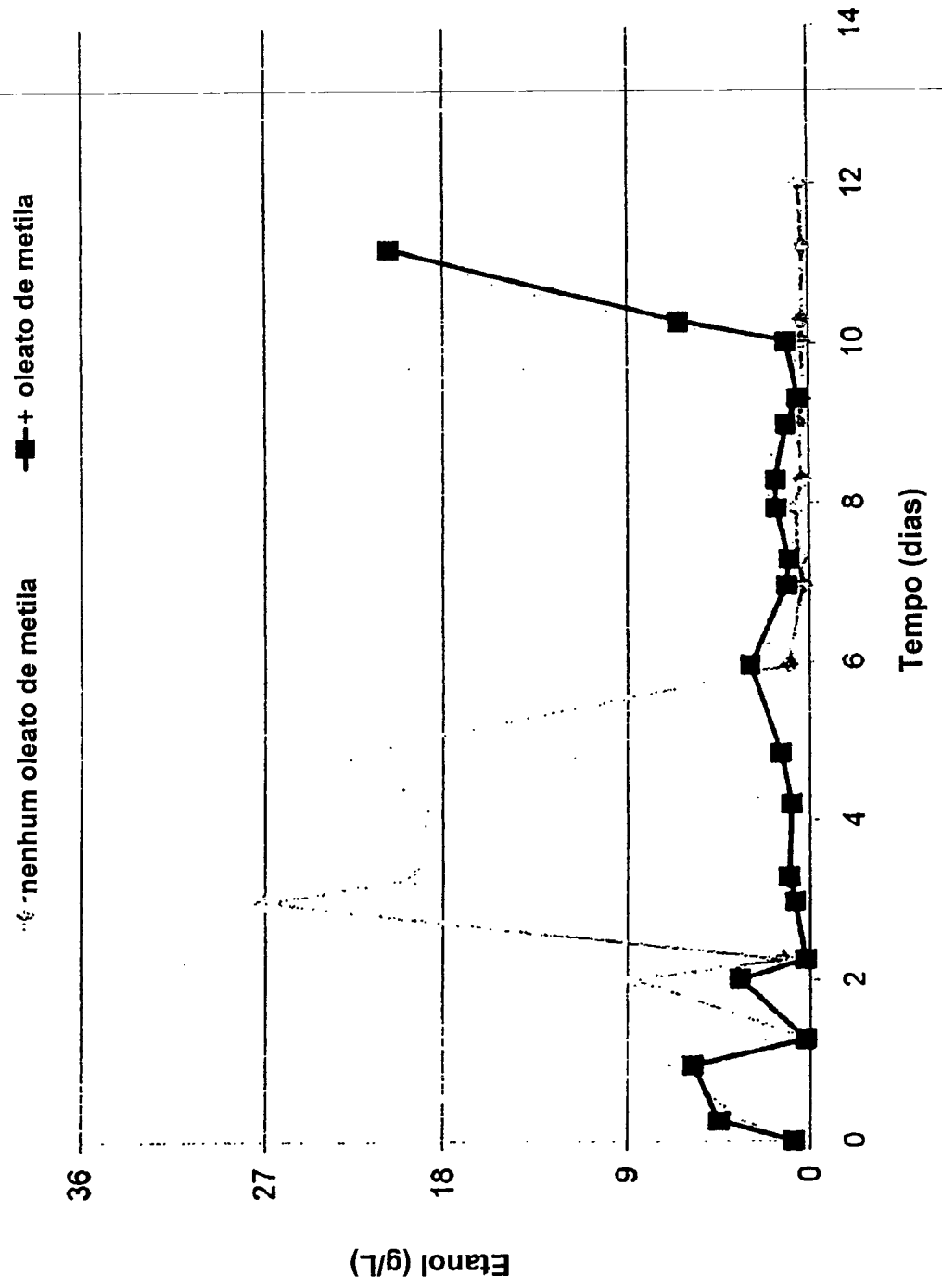


Figura 9B

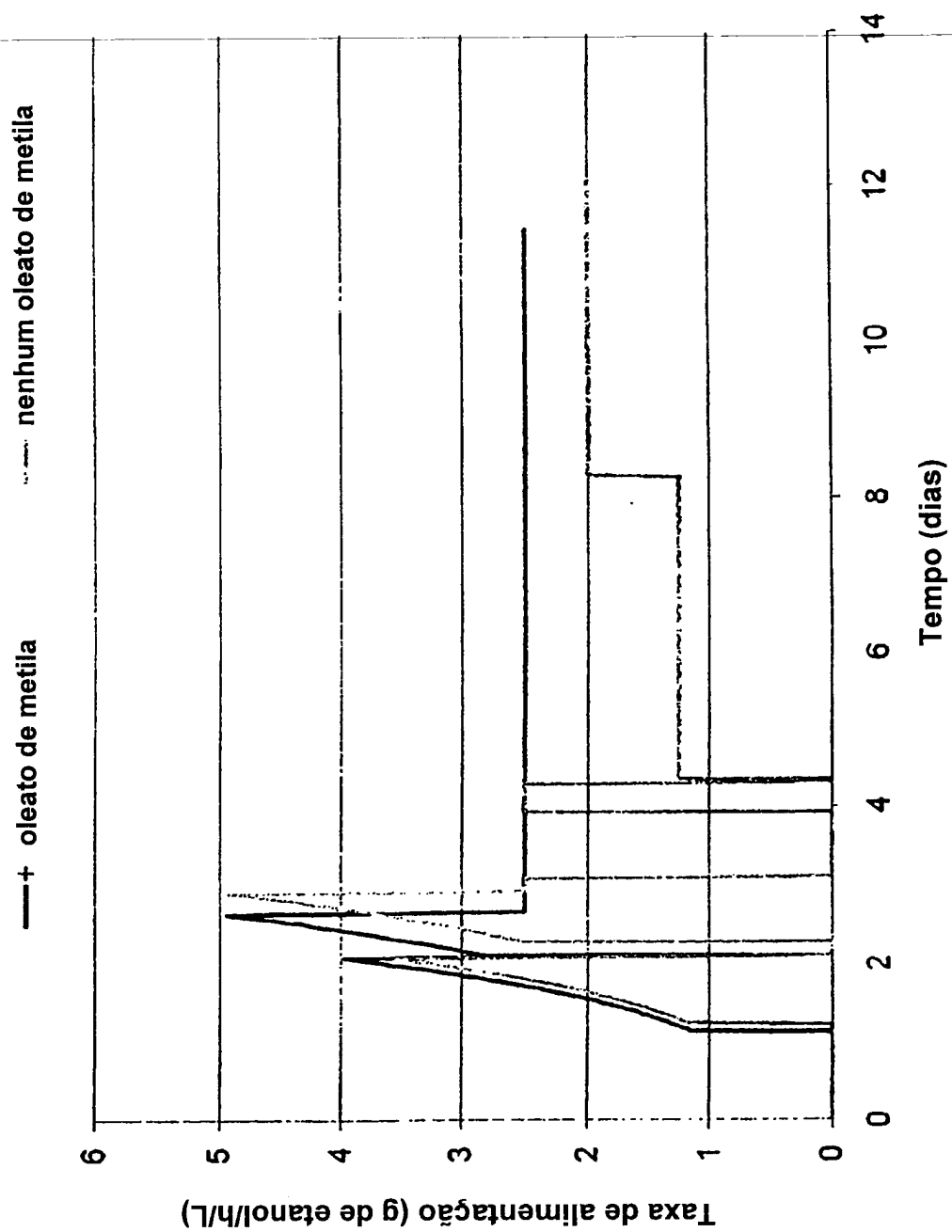


Figura 9C

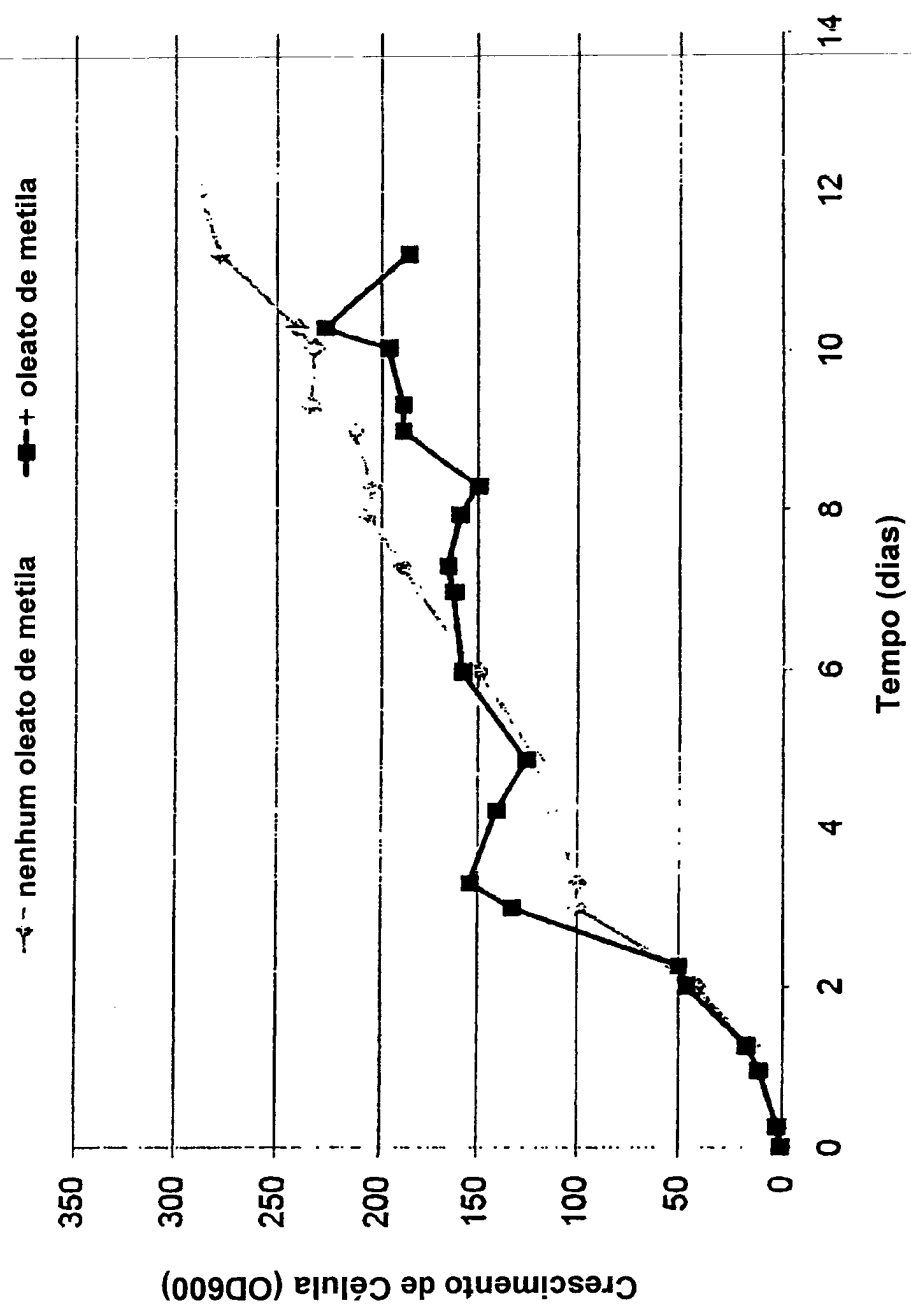


Figura 9D

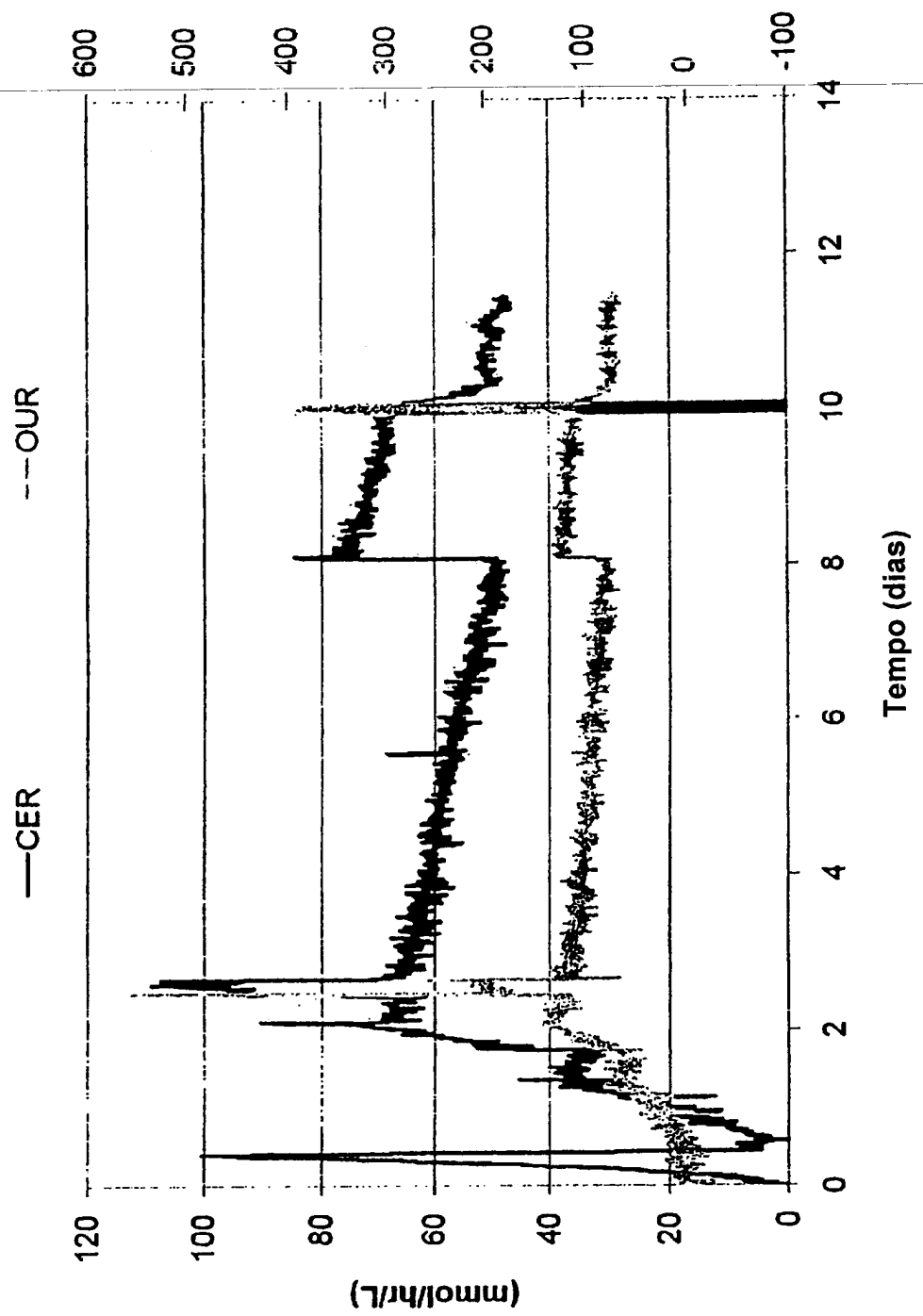


Figura 9E

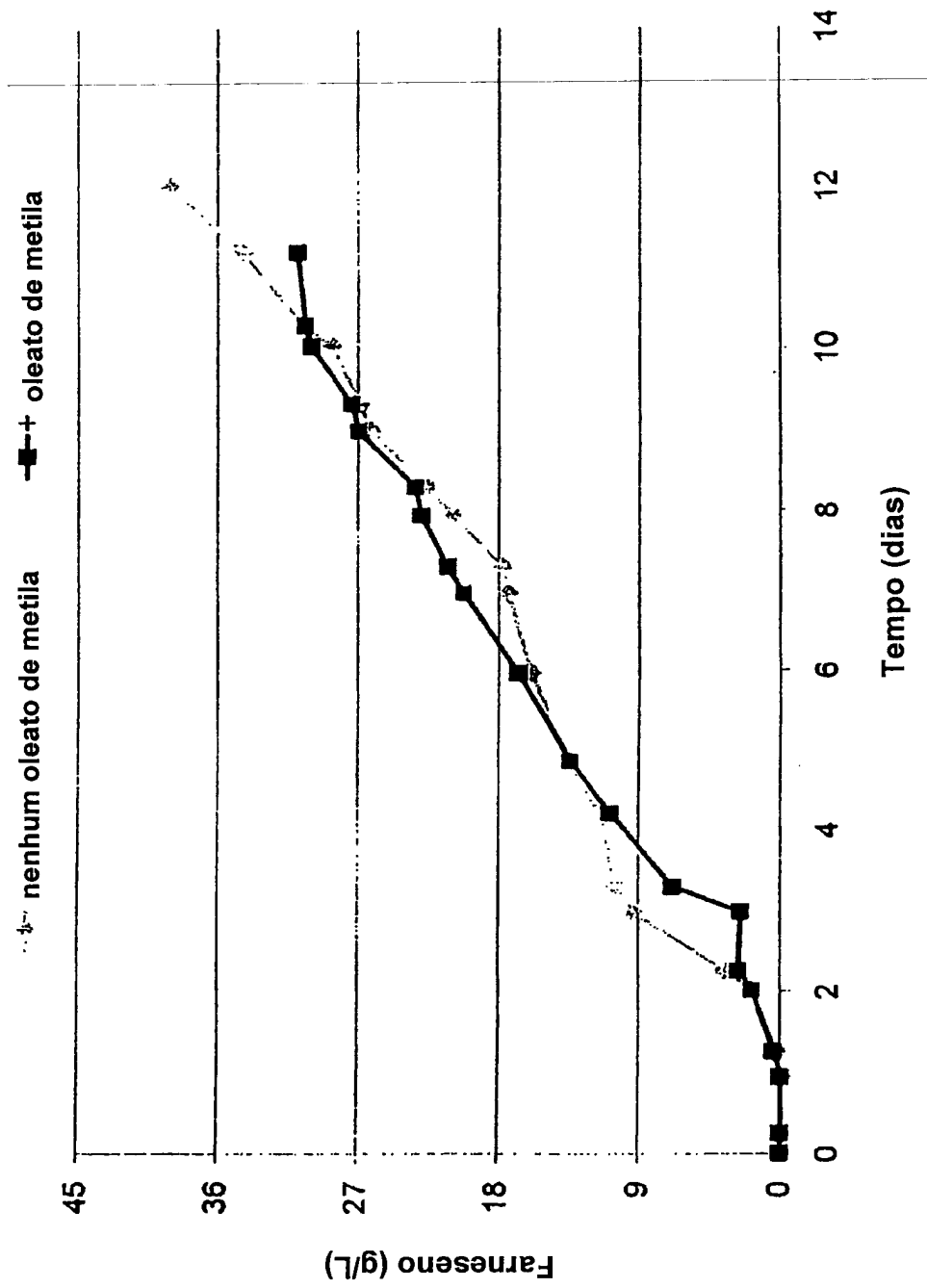


Figura 10A

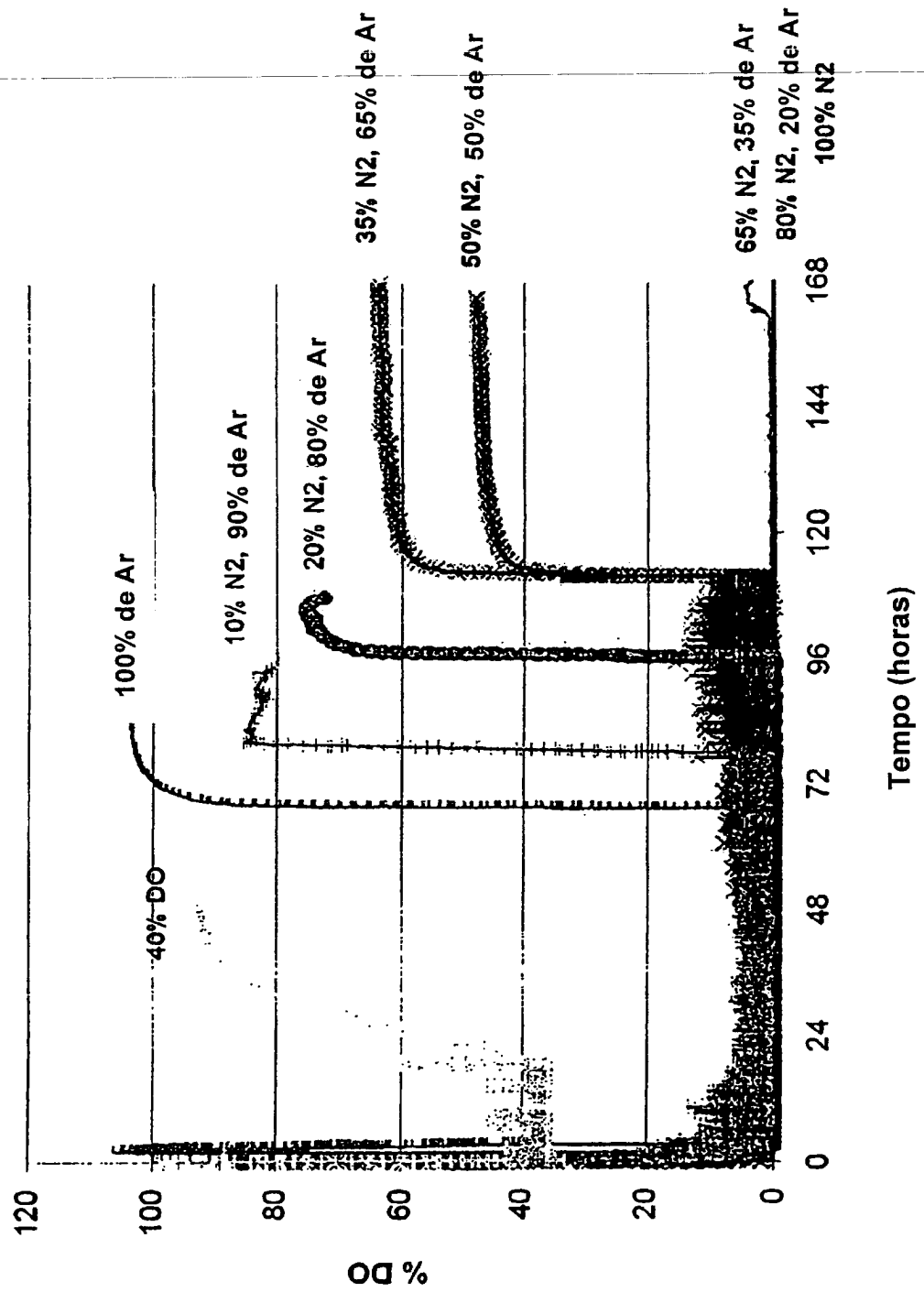




Figura 10C

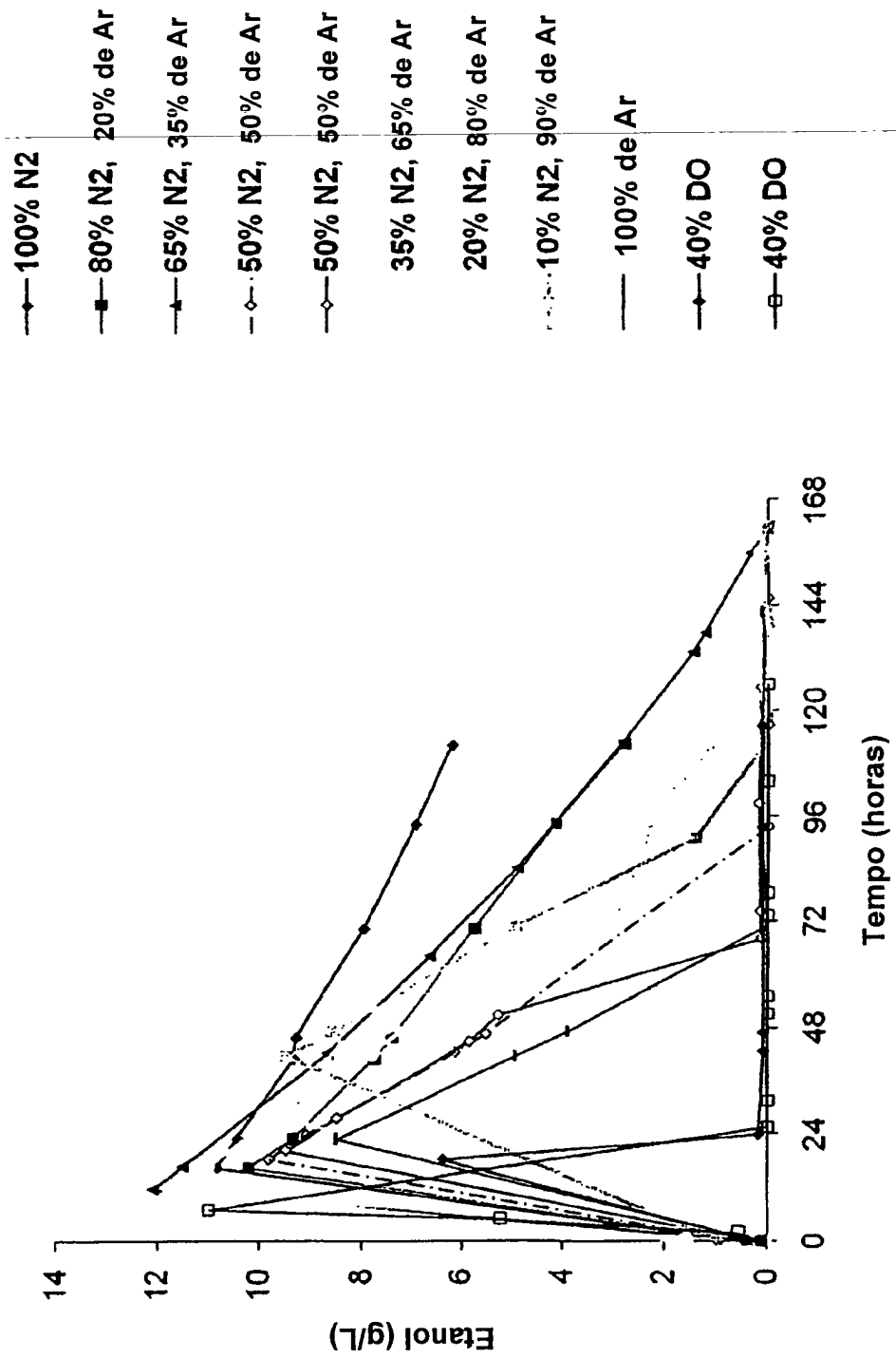




Figura 10E

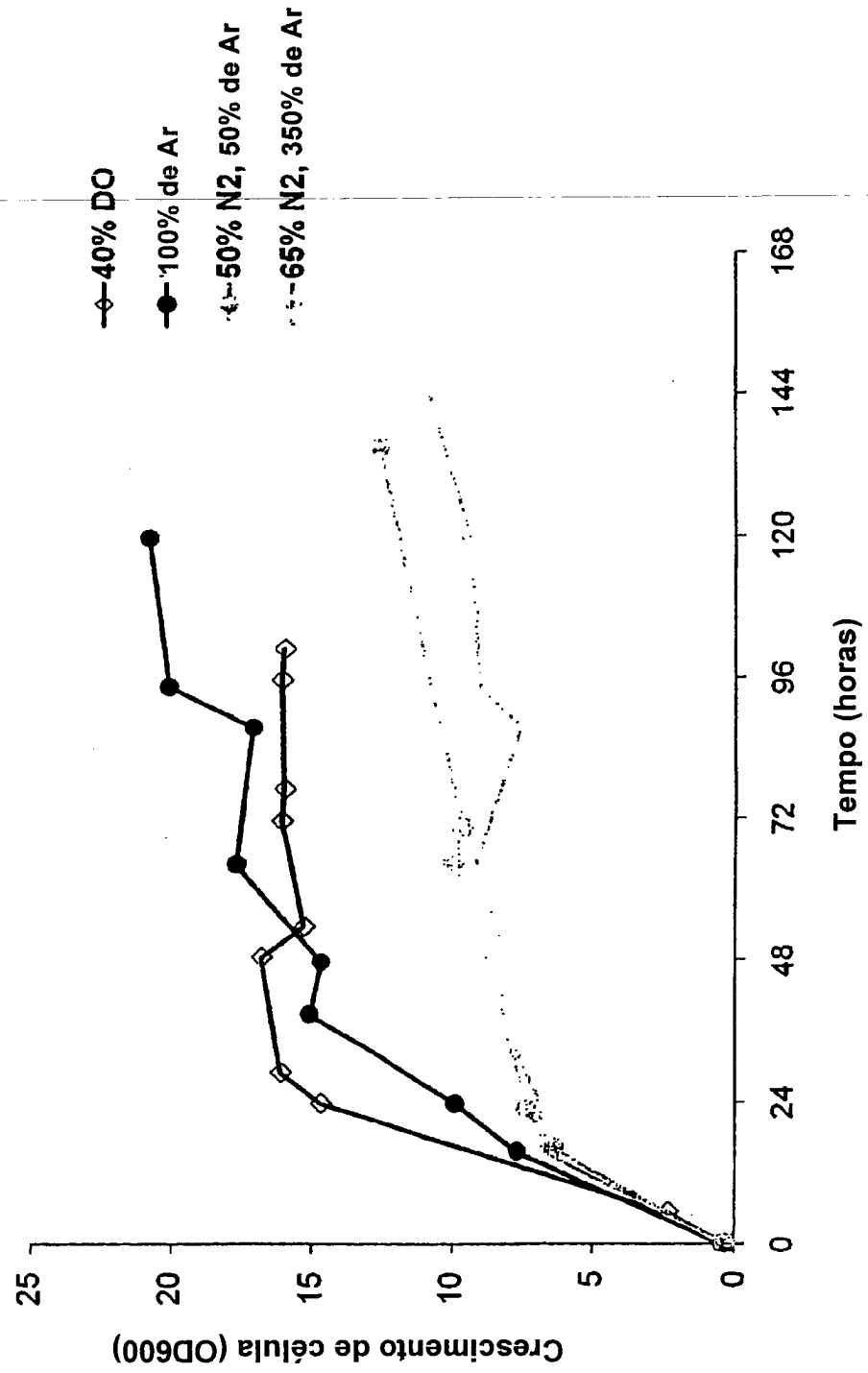


Figura 10F

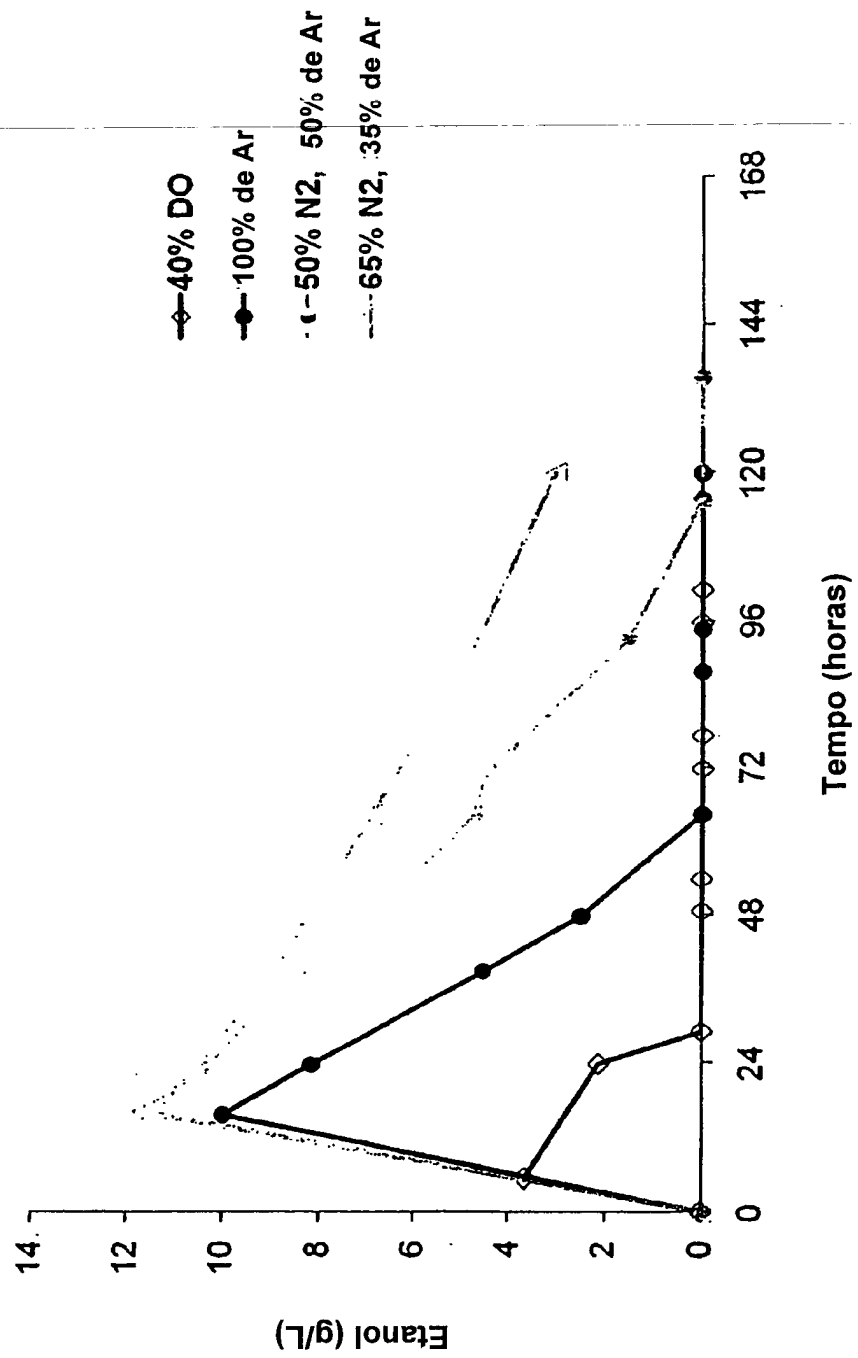


Figura 10G

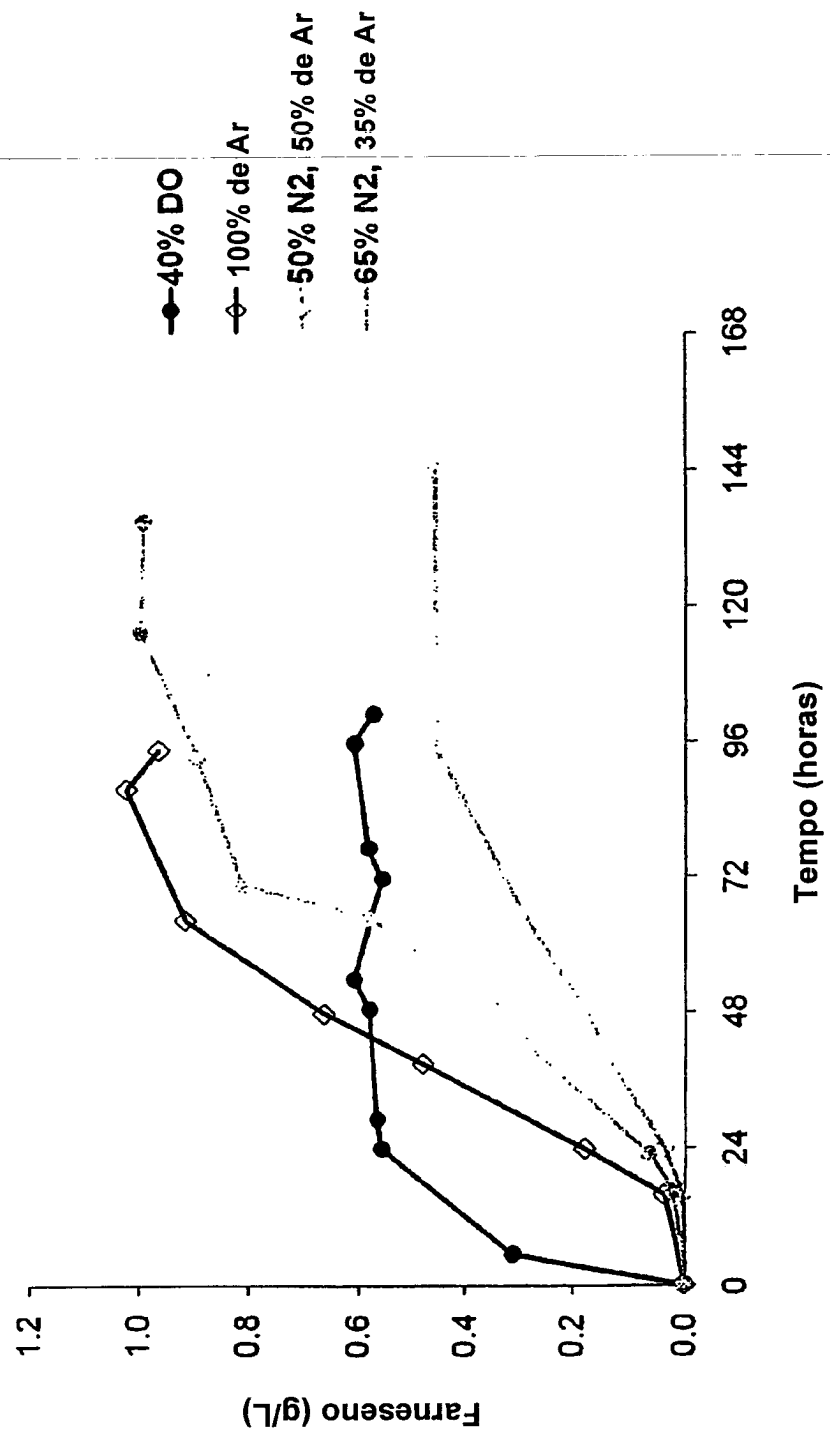


Figura 11

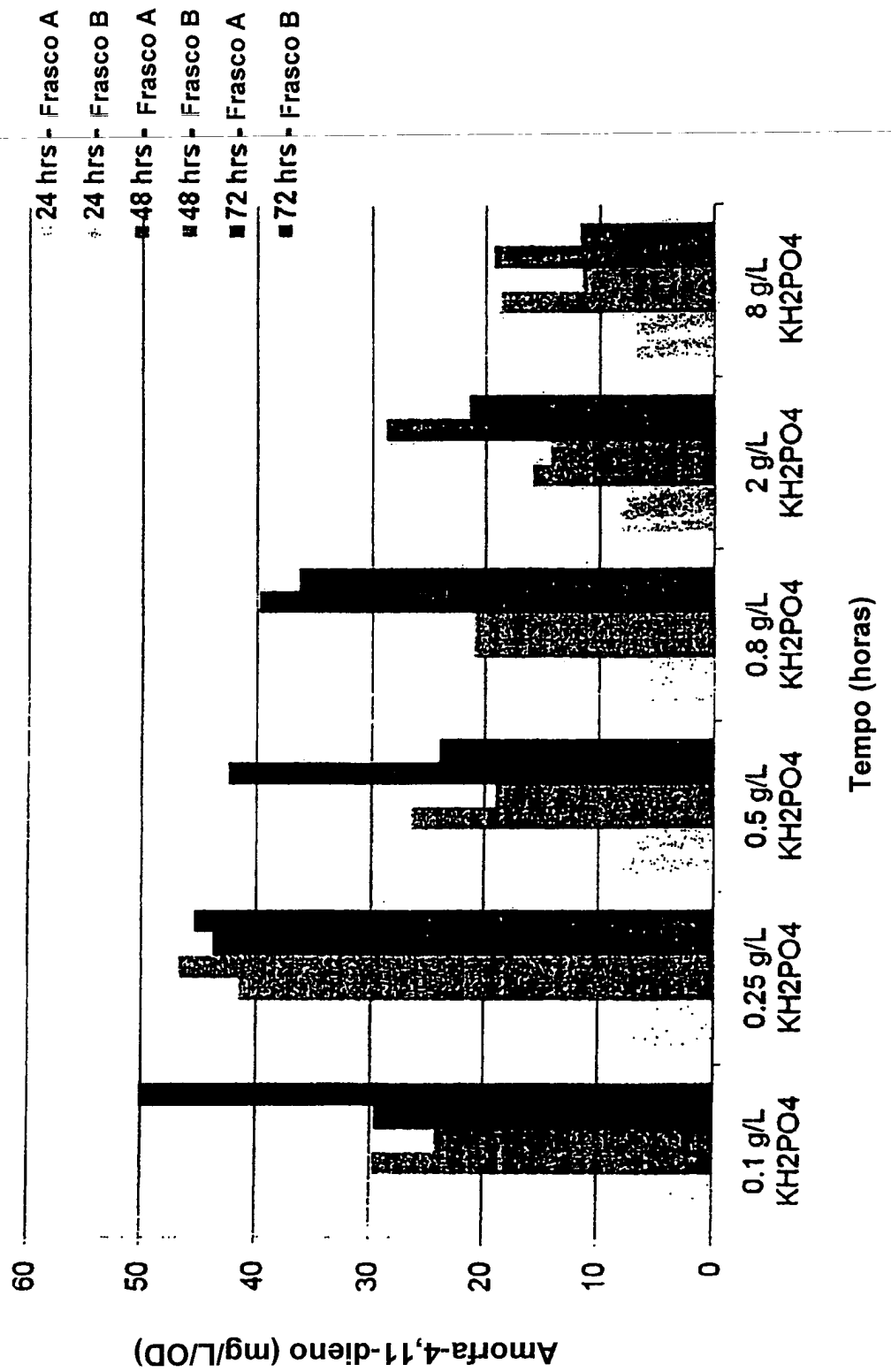


Figura 12A

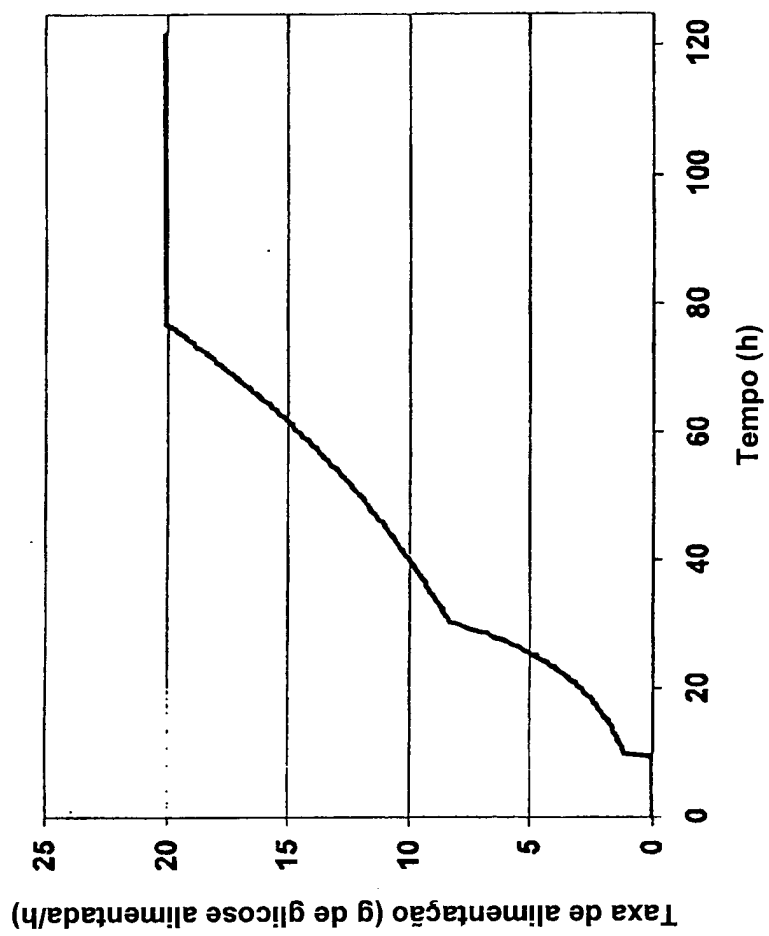


Figura 12B

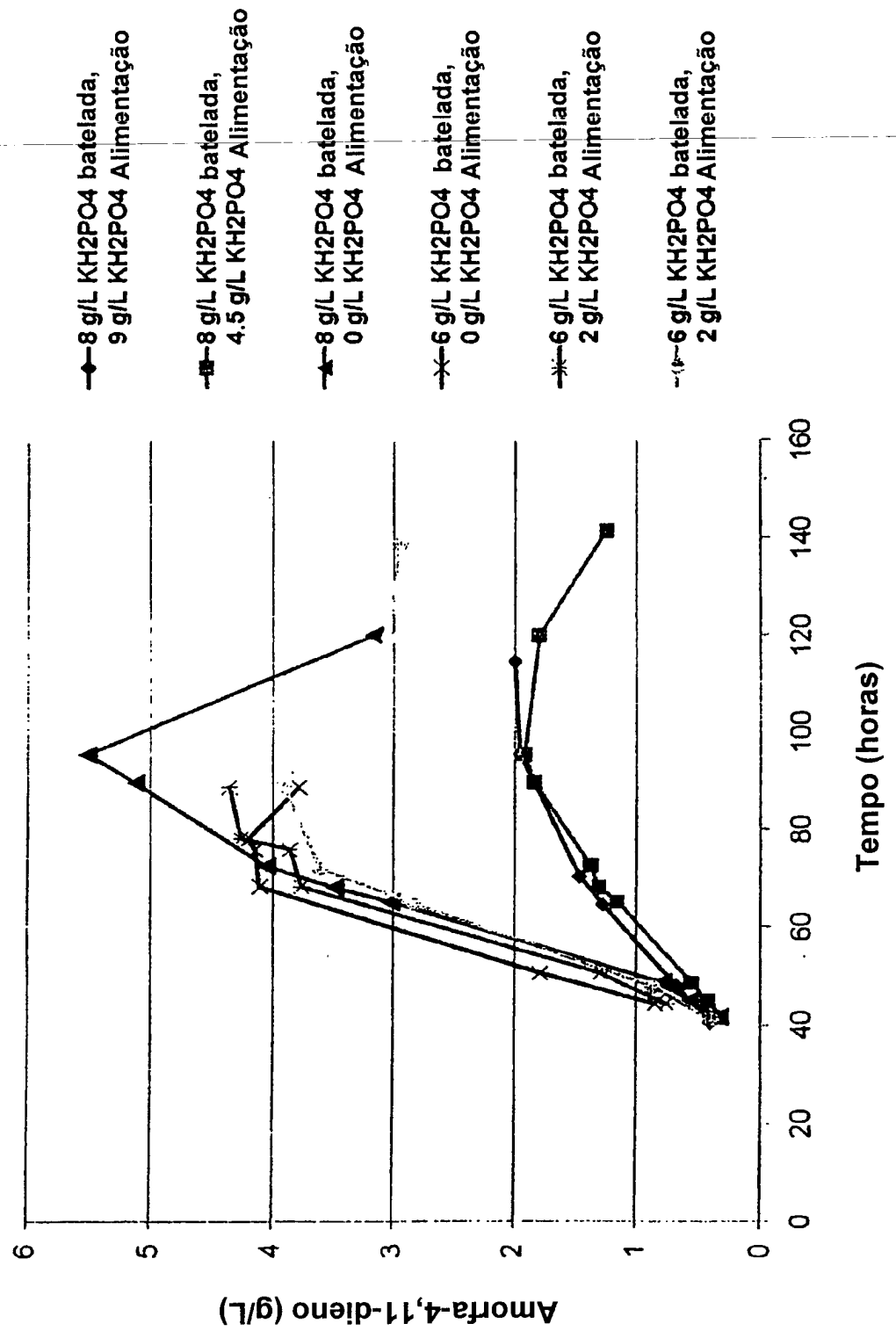


Figura 12C

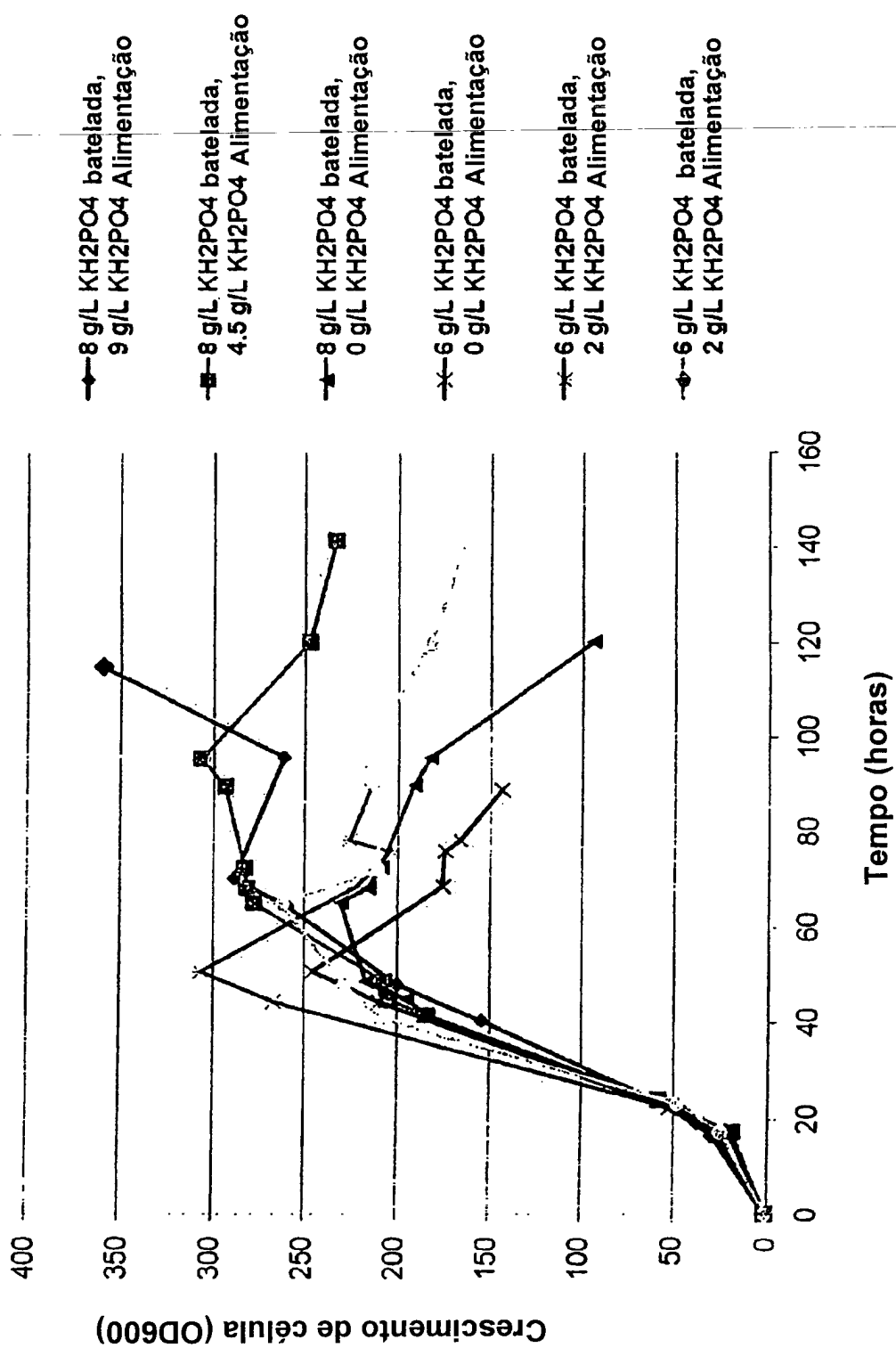






Figura 14

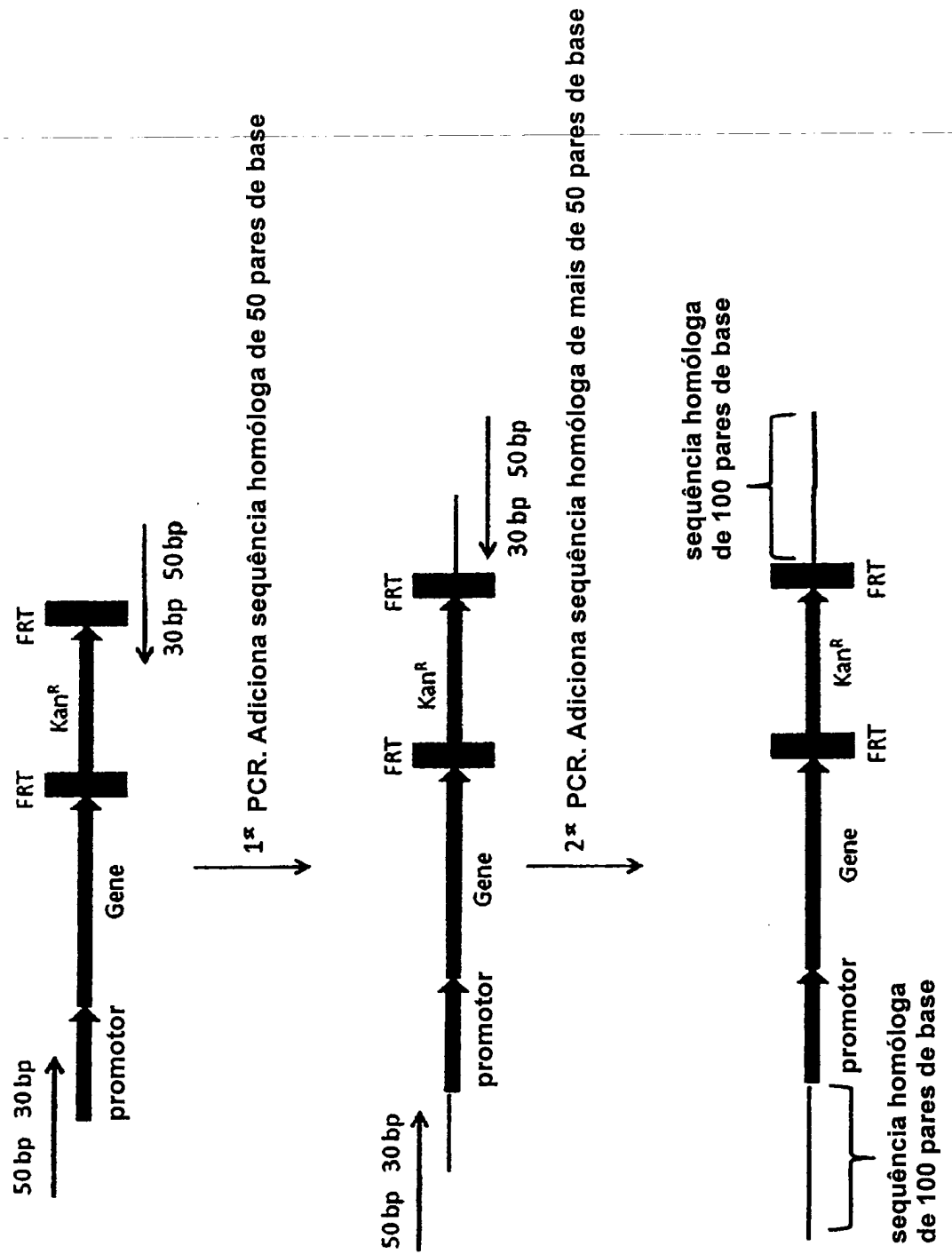


Figura 15

