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

(21) PI 0918453-8 A2

BRPI0918453A2

(22) Data do Depósito: 15/09/2009

(43) Data da Publicação Nacional: 17/12/2019

(54) Título: SISTEMAS USANDO CULTURA DE CÉLULAS PARA A PRODUÇÃO DE ISOPRENO

(51) Int. Cl.: C12N 1/20; C12R 1/00; C07C 11/18.

(30) Prioridade Unionista: 15/09/2008 US 61/097,163; 17/06/2009 US 61/187,832.

(71) Depositante(es): DANISCO US INC.; THE GOODYEAR TIRE & RUBBER COMPANY.

(72) Inventor(es): GOPAL K. CHOTANI; JOSEPH C. MCAULIFFE; CAROLINE M. PERES; GREGORY M. WHITED.

(86) Pedido PCT: PCT US2009057039 de 15/09/2009

(87) Publicação PCT: WO 2010/031079 de 18/03/2010

(85) Data da Fase Nacional: 15/03/2011

(57) Resumo: SISTEMAS USANDO CULTURA DE CÉLULAS PARA A PRODUÇÃO DE ISOPRENO A presente invenção caracteriza métodos para produzir isopreno a partir de células cultivadas. A invenção também fornece composições que incluem essas células cultivadas. A invenção fornece composições de iso-preno, como composições com quantidade aumentada de isopreno ou pu-reza aumentada. Adicionalmente, a invenção fornece métodos para produzir isopreno ao mesmo tempo em que mantém a viabilidade celular e/ou atividade metabólica.

Fig. 1



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"SISTEMAS USANDO CULTURA DE CÉLULAS PARA A PRODUÇÃO DE ISOPRENO"**.

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

Estes pedidos reivindicam o benefício pelo pedido de patente provisória U.S. 61/097.163, depositado em 15 de setembro de 2008, e pedido de patente provisória U.S. 61/187.832, depositado em 17 de junho de 2009, o conteúdo de ambos está incluído por meio deste como referência em sua totalidade.

Antecedentes da Invenção

O isopreno (2-metil-1,3-butadieno) é o material de partida principal para uma variedade de polímeros sintéticos, principalmente borrachas sintéticas. O isopreno é naturalmente produzido por uma variedade de espécies de micróbios, plantas e animais. Especificamente, duas vias foram identificadas para a biossíntese isopreno: a via do mevalonato (MVA) e a via do não mevalonato (DXP) (figuras 19A e 19B). No entanto, o rendimento do isopreno originado de organismos naturais é comercialmente pouco atraente. Cerca de 800.000 toneladas por ano de *cis*-poli-isopreno são produzidas a partir da polimerização do isopreno; parte de tal poli-isopreno é utilizada na indústria de pneus e borracha. O isopreno também é copolimerizado para o uso como elastômero sintético em produtos como calçados, produtos mecânicos, produtos médicos, artigos de esporte e látex.

Atualmente, a indústria de pneus e borrachas é baseada no uso de borracha natural e sintética. A borracha natural é obtida através do suco leitoso de árvores de borracha encontradas nas florestas tropicais da África. A borracha sintética é principalmente baseada em polímeros de butadieno. Para tais polímeros, o butadieno é obtido como coproduto da produção de etileno e propileno.

Enquanto o isopreno pode ser obtido pelo fracionamento de petróleo, a purificação de tal material é cara e lenta. O craqueamento de petróleo do fluxo C5 de hidrocarbonetos produz somente cerca de 15% de isopreno. Dessa forma, métodos mais econômicos para a produção de isopreno

são necessários. Especificamente, métodos para a produção de isopreno em taxas, concentrações e pureza que sejam suficientes para se adequar às exigências de um processo comercial exigente são desejáveis. São também desejáveis sistemas para a produção de isopreno a partir de materiais base econômicos.

A invenção aqui fornecida se direciona a essas necessidades, assim como fornece benefícios adicionais.

Breve Sumário da Invenção

A presente invenção também fornece, *inter alia*, composições, sistemas, células e métodos para a produção de um composto com um ou ambos das seguintes características: (a) um coeficiente da lei de Henry inferior a cerca de 250M/atm e/ou (b) uma solubilidade em água de menos de cerca de 100 g/L. Em uma modalidade, o composto é isopreno. Em uma modalidade, o composto é etileno. A invenção também fornece métodos para a produção de isopreno que compreendem: a) a cultura de células sob condições adequadas para a produção de isopreno; e b) a produção de isopreno,em que as células produzem mais de cerca de 400 nmol/g_{wcm}/h de isopreno e a taxa de evolução de dióxido de carbono das células é maior que cerca de 1 x 10^{-18}mmol/L/hora. Em algumas modalidades, os métodos compreendem ainda recuperar o composto, tal como isopreno. Em uma modalidade, as células compreendem ainda um ou mais ácidos nucleicos heterólogos ou uma ou mais cópias adicionais de um ácido nucleico endógeno que codifica um polipeptídio de isopreno sintase. Em outra modalidade, as células compreendem ainda um ou mais ácidos nucleicos heterólogos ou uma ou mais cópias adicionais de um ácido nucleico endógeno que codifica um polipeptídio de IDI, uma enzima da via do MVA ou uma enzima da via do DXP. Em outra modalidade, a enzima da via do MVA é mevalonatro quinase.

São adicionalmente fornecidos aqui métodos para produzir isopreno compreendendo: a) a cultura de células sob condições adequadas para a produção de isopreno; e b) a produção de isopreno,em que a produtividade total cumulativa do isopreno prdoduzido pelas células em cultura é maior que cerca de 0,2 mg/L_{caldo}/hora e a taxa de evolução de dióxido de

carbono das células é maior que cerca de 1 x 10^{-18}mmol/L/hora. Em algumas modalidades, os métodos compreendem ainda recuperar o isopreno. Em uma modalidade, as células compreendem ainda um ou mais ácidos nucleicos heterólogos ou uma ou mais cópias adicionais de um ácido nucleico endógeno que codifica um polipeptídio de isopreno sintase. Em outra modalidade, as células compreendem ainda um ou mais ácidos nucleicos heterólogos ou uma ou mais cópias adicionais de um ácido nucleico endógeno que codifica um polipeptídio de IDI, uma enzima da via do MVA ou uma enzima da via do DXP. Em outra modalidade, a enzima da via do MVA é mevalonatro quinase.

Também são aqui fornecidos métodos para produzir isopreno compreendendo: a) a cultura de células sob condições adequadas para a produção de isopreno; e b) a produção de isopreno,em que a concentração de pico do isopreno produzido pelas células em cultura é maior que cerca de 10ng/L_{caldo} e a taxa de evolução de dióxido de carbono das células é maior que cerca de 1 x 10^{-18}mmol/L/hora. Em algumas modalidades de quaisquer desses métodos, a taxa de evolução de dióxido de carbono está entre cerca de qualquer dentre 1 x 10^{-18}mmol/L/hora a cerca de 1 mol/L/hora, 1 mmol/L/hora a 1 mol/L/hora, 25 mmol/L/hora a 750 mmol/L/hora, 25 mmol/L/hora a 75 mmol/L/hora, 250 mmol/L/hora a 750 mmol/L/hora, ou 450 mmol/L/hora a 550 mmol/L/hora. Em algumas modalidades, a taxa de evolução de dióxido de carbono é de cerca de 50 mmol/L/hora ou cerca de 500 mmol/L/hora. Em algumas modalidades, os métodos compreendem ainda recuperar o isopreno. Em uma modalidade, as células compreendem ainda um ou mais ácidos nucleicos heterólogos ou uma ou mais cópias adicionais de um ácido nucleico endógeno que codifica um polipeptídio de isopreno sintase. Em outra modalidade, as células compreendem ainda um ou mais ácidos nucleicos heterólogos ou uma ou mais cópias adicionais de um ácido nucleico endógeno que codifica um polipeptídio de IDI, uma enzima da via do MVA ou uma enzima da via do DXP. Em outra modalidade, a enzima da via do MVA é mevalonatro quinase.

São adicionalmente fornecidas aqui células em cultura compre-

endendo um ácido nucleico codificando um polipeptídio de isopreno sintase, em que as células produzem mais de cerca de 400 nmol/g_{wcm}/hora de isopreno e a taxa de evolução de dióxido de carbono das células é maior que cerca de 1 x 10^{-18}mmol/L/hora. Também são aqui fornecidas células em cultura compreendendo um ácido nucleico codificando um polipeptídio de isopreno sintase, em que a produtividade total cumulativa do isopreno produzido pelas células em cultura é maior que cerca de 0,2 mg/L_{caldo}/hora e a taxa de evolução de dióxido de carbono das células é maior que cerca de 1 x 10^{-18}mmol/L/hora. Além disso, são aqui fornecidas células em cultura compreendendo um ácido nucleico codificando um polipeptídio de isopreno sintase, em que a concentração de pico do isopreno produzido pelas células em cultura é maior que cerca de 10ng/L_{caldo} e a taxa de evolução de dióxido de carbono das células é maior que cerca de 1 x 10^{-18}mmol/L/hora. Em algumas modalidades de quaisquer dessas células em cultura, a taxa de evolução de dióxido de carbono está entre cerca de qualquer dentre 1 x 10^{-18}mmol/L/hora a cerca de 1 mol/L/hora, 1 mmol/L/hora a 1 mol/L/hora, 25 mmol/L/hora a 750 mmol/L/hora, 25 mmol/L/hora a 75 mmol/L/hora, 250 mmol/L/hora a 750 mmol/L/hora, ou 450 mmol/L/hora a 550 mmol/L/hora. Em algumas modalidades, a taxa de evolução de dióxido de carbono é de cerca de 50 mmol/L/hora ou cerca de 500 mmol/L/hora. A invenção também fornece composição e/ou sistemas compreendendo um ou mais de quaisquer da células aqui divulgadas.

Também são aqui fornecidos métodos para produzir isopreno compreendendo: a) a cultura de células sob condições adequadas para a produção de isopreno; e b) a produção de isopreno,em que a concentração da fase líquida de isopreno é menor que cerca de 2 g/L e as células produzem mais que cerca de 400 nmol/g_{wcm}/hora de isopreno. Em algumas modalidades, a concentração da fase líquida de isopreno na cultura é inferior a cerca de 1 g/L. Em algumas modalidades, a concentração da fase líquida de isopreno na cultura é inferior a cerca de 200 mg/L. Em algumas modalidades, a concentração da fase líquida de isopreno na cultura é inferior a qualquer de cerca de 1,9 g/L, 1,8 g/L, 1,7 g/L, 1,6 g/L, 1,5 g/L, 1,4 g/L, 1,3 g/L,

1,2 g/L, ou 1,1 g/L, Em algumas modalidades, a concentração da fase líquida de isopreno na cultura é inferior a qualquer de cerca de 900 mg/L, 800 mg/L, 700 mg/L, 600 mg/L, 500 mg/L, 400 mg/L, ou 300 mg/L. Em algumas modalidades, a concentração da fase líquida de isopreno na cultura é inferior a qualquer de cerca de175 mg/L, 150 mg/L, 125 mg/L, 100 mg/L, 75 mg/L, 50 mg/L, 25 mg/L, 20 mg/L, 15 mg/L, 10 mg/L, 5 mg/L, ou 2,5 mg/L. Em algumas modalidades, a concentração da fase líquida de isopreno na cultura está entre cerca de qualquer dentre 0,1 mg/L a 200 mg/L, 1 mg/L a 200 mg/L, 1 mg/L a 150 mg/L, 1 mg/L a 100 mg/L, 1 mg/L a 50 mg/L, 1 mg/L a 25 mg/L, 1 mg/L a 20 mg/L, ou 10 mg/L a 20 mg/L, 1 mg/L a 1 g/L, 0.1 mg/L a 2 g/L, 1 g/L a 2 g/L, 10 mg/L a 1 g/L, or 100 mg/L a 1 g/L. Em algumas modalidades, a concentração da fase líquida está abaixo do limite de solubilidade de isopreno. Em algumas modalidades, a fase líquida na cultura está saturada com isopreno, e o isopreno está adicionalmente presente em uma segunda fase líquida. Em algumas modalidades, a segunda fase líquida compreende pelo menos cerca de 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, ou 98% de isopreno. Em algumas modalidades, os métodos compreendem ainda recuperar o isopreno. Em uma modalidade, as células compreendem ainda um ou mais ácidos nucleicos heterólogos ou uma ou mais cópias adicionais de um ácido nucleico endógeno que codifica um polipeptídio de isopreno sintase. Em outra modalidade, as células compreendem ainda um ou mais ácidos nucleicos heterólogos ou uma ou mais cópias adicionais de um ácido nucleico endógeno que codifica um polipeptídio de IDI, uma enzima da via do MVA ou uma enzima da via do DXP. Em outra modalidade, a enzima da via do MVA é mevalonatro quinase.

Também são aqui fornecidos métodos para produzir um composto, em que o composto tem uma ou mais características selecionadas do grupo que consiste em: (a) um coeficiente da lei de Henry inferior a cerca de 250M/atm e/ou (b) uma solubilidade em água de menos de cerca de 100 g/L. Em algumas modalidades, o método compreende: a) a cultura de células sob condições adequadas para a produção do composto, em que é adicionado gás (como a adição de gás a um sistema como um sistema de fermen-

tação) em uma taxa de pulverização gasosa entre cerca de 0,01 vvm e cerca de 2 vvm; e b) a produção do composto. Em uma modalidade, condições anaeróbicas são usadas, Em outra modalidade, a taxa de pulverização gasosa é 0 vvm. Em outra modalidade, a taxa de pulverização gasosa é 0 vvm – 0,01 vvm. Em outras modalidades, o método compreende: a cultura de células sob condições adequadas para a produção do composto; b) a produção do composto; e c) a recuperação do composto na fase gasosa. Em outras modalidades, o método compreende: a cultura de células sob condições adequadas para a produção do composto; b) a produção do composto; e c) a recuperação do composto a partir da fase gasosa. Em uma modalidade, o composto produzido é etileno. Em algumas modalidades, o coeficiente da lei de Henry do composto é inferior a cerca de qualquer dentre 200 M/atm, 150 M/atm, 100 M/atm, 75 M/atm, 50 M/atm, 25 M/atm, 10 M/atm, 5 M/atm, ou 1 M/atm. Em algumas modalidades, a solubilidade em água do composto é inferior a cerca de qualquer dentre 75 g/L, 50 g/L, 25 g/L, 10 g/L, 5 g/L, ou 1g/L. Em algumas modalidades, o composto é selecionado de um grupo que consiste em isopreno, um aldeído (por exemplo, acetaldeído), uma cetona (por exemplo, acetona, metil etil cetona ou 2-butanona), um álcool (por exemplo, metanol, etanol, 1-butanol, ou alcoóis C5 como 3-metil-3-buten-1-ol ou 3-metil-2-buten-1-ol), um éster de um álcool (por exemplo, acetato de etila, ésteres de 3-metil-2-buten-1-ol, ou acetil ésteres de alcoóis C5), um hemiterpeno, um monoterpeno, um sesquiterpeno e hidrocarbonetos C1 a C5 (por exemplo, metano, etano, etileno ou propileno). Em algumas modalidades, os hidrocarbonetos C1 a C5 são saturados, insaturados ou ramificados. Em algumas modalidades, o hidrocarboneto C1 a C5 é um hidrocarboneto alifático insaturado (por exemplo, etileno, propeno, butileno, ou isobutileno). Em algumas modalidades, o hidrocarboneto C1 a C5 é uma oleofina. Em modalidades particulares, o composto é isopreno. Em outras modalidades particulares, o composto é etileno. Em algumas modalidades dos métodos para produzir quaisquer dos compostos descritos acima, a taxa de pulverização gasosa está entre cerca de qualquer dentre 0 vvm a 0,1 vvm, 0,1 vvm a 1 vvm, 0,2 vvm a 1 vvm, ou 0,5 vvm a 1 vvm. Em algumas modalidades dos

métodos para produzir quaisquer dos compostos descritos acima, a taxa de pulverização gasosa é 0,0 vvm.

Sob um aspecto, a invenção caracteriza métodos para produzir etileno, Em algumas modalidades, o método compreende: a) a cultura de células sob condições adequadas para a produção de etileno, em que é adicionado gás (como a adição de gás a um sistema como um sistema de fermentação) em uma taxa de pulverização gasosa entre cerca de 0,01 vvm e cerca de 2 vvm; e b) a produção de etileno. Em outras modalidades, o método compreende: a) a cultura de células sob condições adequadas para a produção de etileno; e b) a produção de etileno; e c) a recuperação do etileno na fase gasosa. Em algumas modalidades dos métodos para produzir etileno, a taxa de pulverização gasosa está entre cerca de qualquer dentre 0 vvm a 0,1 vvm, 0,1 vvm a 1 vvm, 0,2 vvm a 1 vvm, ou 0,5 vvm a 1 vvm. Em algumas modalidades dos métodos para produzir etileno, a taxa de pulverização gasosa é 0,0 vvm.

Em quaisquer das modalidades, os métodos compreendem ainda a recuperação de isopreno e/ou etileno. Em algumas modalidades, etileno é recuperado por adsorção. Em uma modalidade particular, o etileno é adsorvido em argila modificada por prata. Em outras modalidades, o etileno é recuperado por separação criogênica ou absorção/arraste.

Sob um aspecto, a invenção apresenta células em cultura que produzem isopreno. Em algumas modalidades, a invenção fornece células em cultura que produzem mais de cerca de 400 nmols de isopreno/grama de células para o peso úmido das células/hora (nmol/g_{wcm}/h) de isopreno. Em algumas modalidades, as células possuem um ácido nucleico heterólogo que (i) codifica um polipeptídio de isopreno sintase e (ii) é ligado de forma operacional a um promotor. Em algumas modalidades, as células são cultivadas em meio de cultura que inclui uma fonte de carbono, como, mas não limitado a, um carboidrato, gicerol, glicerina, di-hidroxiacetona, carbono de uma fonte, óleo, gordura animal, óleo animal, ácido graxo, lipídio, fosfolipídio, gicerolipídio, monoglicerídeo, diglicerídeo, triglicerídeo, fonte de carbono renovável, polipeptídio (por exemplo, uma proteína ou peptídeo vegetal ou

microbiano), extrato de levedura, componente de um extrato de levedura, ou qualquer combinação de dois ou mais dos precedentes. Em algumas modalidades, as células são cultivadas sob condições de glicose limitada.

Em algumas modalidades, a invenção fornece células em cultura que convertem mais de cerca de 0,002% do carbono em um meio de cultura de células em isopreno. Em algumas modalidades, as células possuem um ácido nucleico heterólogo que (i) codifica um polipeptídio de isopreno sintase e (ii) é ligado de forma operacional a um promotor. Em algumas modalidades, as células são cultivadas em um meio de cultura que inclui uma fonte de carbono, como, mas não limitado a, um carboidrato, gicerol, glicerina, dihidroxiacetona, carbono de uma fonte, óleo, gordura animal, óleo animal, ácido graxo, lipídio, fosfolipídio, gicerolipídio, monoglicerídeo, diglicerídeo, triglicerídeo, fonte de carbono renovável, polipeptídio (por exemplo, uma proteína ou peptídeo vegetal ou microbiano), extrato de levedura, componente de um extrato de levedura, ou qualquer combinação de dois ou mais dos precedentes. Em algumas modalidades, as células são cultivadas sob condições de glicose limitada.

Em algumas modalidades, a invenção fornece células em cultura que compreendem um ácido nucleico heterólogo codificando um polipeptídio de isopreno sintase. Em algumas modalidades, as células possuem um ácido nucleico heterólogo que (i) codifica um polipeptídio de isopreno sintase e (ii) é ligado de forma operacional para um promotor. Em algumas modalidades, as células são cultivadas em um meio de cultura que inclui uma fonte de carbono, como, mas não limitado a, um carboidrato, gicerol, glicerina, dihidroxiacetona, carbono de uma fonte, óleo, gordura animal, óleo animal, ácido graxo, lipídio, fosfolipídio, gicerolipídio, monoglicerídeo, diglicerídeo, triglicerídeo, fonte de carbono renovável, polipeptídio (por exemplo, uma proteína ou peptídeo vegetal ou microbiano), extrato de levedura, componente de um extrato de levedura, ou qualquer combinação de dois ou mais dos precedentes. Em algumas modalidades, as células são cultivadas sob condições de glicose limitada.

Sob um aspecto, a invenção apresenta células em cultura que

produzem um composto, em que o composto tem uma ou mais características selecionadas do grupo que consiste em (a) um coeficiente da lei de Henry inferior a cerca de 250M/atm e (b) uma solubilidade em água de menos de cerca de 100 g/L. Em algumas modalidades, as células possuem um ácido nucleico heterólogo que (i) codifica polipeptídio sintase capaz de produzir o composto e (ii) é ligado de forma operacional a um promotor. Em algumas modalidades, o composto produzido é etileno e o polipeptídio sintase é enzima que forma etileno (efe). Em algumas modalidades, as células são cultivadas em um meio de cultura que inclui uma ou mais fontes de carbono, como, mas não limitado a, um carboidrato, glicerol, glicerina, di-hidroxiacetona, fonte de um carbono, óleo, gordura animal, óleo animal, ácido graxo, lipídio, fosfolipídio, gicerolipídio, monoglicerídeo, diglicerídeo, triglicerídeo, fonte de carbono renovável, polipeptídio (por exemplo, uma proteína ou peptídeo vegetal ou microbiano), extrato de levedura, componente de um extrato de levedura. Em algumas modalidades, as células são cultivadas sob condições de glicose limitada.

Sob um aspecto, a invenção apresenta métodos para produzir isopreno, como métodos para usar quaisquer das células descritas aqui para produzir isopreno. Em algumas modalidades, o método envolve cultivar células sob condições suficientes para produzir mais que cerca de 400 nmol/g_{wcm}/hora de isopreno. Em algumas modalidades, o método também inclui recuperar o isopreno produzido pelas células. Em algumas modalidades, o método inclui purificar o isopreno produzido pelas células. Em algumas modalidades, o método inclui polimerizar o isopreno. Em algumas modalidades, as células possuem um ácido nucleico heterólogo que (i) codifica um polipeptídio de isopreno sintase e(ii) é ligado de forma operacional a um promotor. Em algumas modalidades, as células são cultivadas em um meio de cultura que inclui uma fonte de carbono, limitado a, um carboidrato, glicerol, glicerina, di-hidroxiacetona, fonte de um carbono, óleo, gordura animal, óleo animal, ácido graxo, lipídio, fosfolipídio, gicerolipídio, monoglicerídeo, diglicerídeo, triglicerídeo, fonte de carbono renovável, polipeptídio (por exemplo, uma proteína ou peptídeo vegetal ou microbiano), extrato de levedu-

ra, componente de um extrato de levedura, ou qualquer combinação de dois ou mais dos precedentes. Em algumas modalidades, as células são cultivadas sob condições de glicose limitada. Em várias modalidades, a quantidade de isopreno produzido (como a quantidade total de isopreno produzido ou a quantidade de isopreno produzido por litro de caldo por hora por OD_{600}) durante a fase estacionária é maior que ou cerca de 2 ou mais vezes a quantidade de isopreno produzido durante a fase de crescimento pela mesma quantidade de tempo. Em algumas modalidades, a fase gasosa compreende mais ou cerca de 9,5 % (volume) de oxigênio e a concentração de isopreno em uma fase gasosa é menor que o limite inferior de inflamabilidade ou maior que o limite superior de inflamabilidade. Em modalidades específicas, (i) a concentração de isopreno em uma fase gasosa é menor que o limite inferior de inflamabilidade ou maior que o limite superior de inflamabilidade e (ii) as células produzem mais de cerca de 400 nmol/g_{wcm}/h de isopreno.

Em algumas modalidades, o método inclui a cultura de células sob condições suficientes para converter mais de cerca de 0,002% do carbono (mol/mol) em uma célula em meio de cultura para isopreno. Em algumas modalidades, o método também inclui a recuperação do isopreno produzido pelas células. Em algumas modalidades, o método inclui a purificação do isopreno produzido pelas células. Em algumas modalidades, o método inclui a polimerização do isopreno. Em algumas modalidades, as células possuem um ácido nucleico heterólogo que (i) codifica um polipeptídio de isopreno sintase e (ii) é ligado de forma operacional a um promotor. Em algumas modalidades, as células são cultivadas em um meio de cultura que inclui uma fonte de carbono, como, mas não limitado a, um carboidrato, glicerol, glicerina, di-hidroxiacetona, fonte de um carbono, óleo, gordura animal, óleo animal, ácido graxo, lipídio, fosfolipídio, glicerolipídio, monoglicerídeo, diglicerídeo, triglicerídeo, fonte de carbono renovável, polipeptídio (por exemplo, uma proteína ou peptídeo vegetal ou microbiano), extrato de levedura, componente de um extrato de levedura, ou qualquer combinação de dois ou mais dos precedentes. Em algumas modalidades, as células são cultivadas sob condições de glicose limitada.

Em algumas modalidades, isopreno é apenas produzido na fase estacionária. Em algumas modalidades, isopreno é produzido tanto na fase de crescimento quanto na fase estacionária. Em várias modalidades, a quantidade de isopreno produzido (como a quantidade total de isopreno produzido ou a quantidade de isopreno produzido por litro de caldo por hora por OD_{600}) durante a fase estacionária é maior que ou cerca de 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, ou mais vezes a quantidade de isopreno produzido durante a fase de crescimento pela mesma quantidade de tempo.

Sob um aspecto, a invenção apresenta métodos para produzir um composto, em que o composto tem uma ou mais características selecionadas do grupo que consiste em (a) um coeficiente da lei de Henry inferior a cerca de 250M/atm e (b) uma solubilidade em água de menos de cerca de 100 g/L, como métodos para usar quaisquer das células aqui descritas para produzir o composto. Em algumas modalidades, o composto produzido é etileno. Em algumas modalidades, o método também inclui recuperar o composto produzido pelas células. Em algumas modalidades, o método inclui purificar o composto produzido pelas células. Em algumas modalidades, o método inclui polimerizar o composto. Em algumas modalidades, as células possuem um ácido nucleico heterólogo que (i) codifica um polipeptídio sintase capaz de produzir o composto e (ii) é ligado de forma operacional a um promotor. Em uma modalidade particular, o ácido nucleico heterólogo codifica efe. Em algumas modalidades, as células são cultivadas em um meio de cultura que inclui uma ou mais fontes de carbono, como, mas não limitado a, um carboidrato, glicerol, glicerina, di-hidroxiacetona, fonte de um carbono, óleo, gordura animal, óleo animal, ácido graxo, lipídio, fosfolipídio, gicerolipídio, monoglicerídeo, diglicerídeo, triglicerídeo, fonte de carbono renovável, polipeptídio (por exemplo, uma proteína ou peptídeo vegetal ou microbiano), extrato de levedura, componente de um extrato de levedura. Em algumas modalidades, as células são cultivadas sob condições de glicose limitada. Em várias modalidades, a quantidade do composto produzido (como a quantidade total do composto produzido ou a quantidade do composto produzido por litro de caldo por hora por OD_{600}) durante a fase estacionária é

maior que ou cerca de 2 ou mais vezes a quantidade do composto produzido durante a fase de crescimento pela mesma quantidade de tempo. Em algumas modalidades, a fase gasosa compreende mais ou cerca de 9,5 % (volume) de oxigênio e a concentração do composto em uma fase gasosa é menor que o limite inferior de inflamabilidade ou maior que o limite superior de inflamabilidade.

Em algumas modalidades, o composto é apenas produzido na fase estacionária. Em algumas modalidades, o composto é produzido tanto na fase de crescimento quanto na fase estacionária. Em várias modalidades, a quantidade do composto produzido (como a quantidade total de isopreno produzido ou a quantidade de isopreno produzido por litro de caldo por hora por OD_{600}) durante a fase estacionária é maior que ou cerca de 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, ou mais vezes a quantidade do composto produzido durante a fase de crescimento pela mesma quantidade de tempo.

Sob um aspecto, a invenção apresenta composições e sistemas que compreendem isopreno. Em algumas modalidades, a composição compreende mais ou cerca de 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, ou 1000 mg de isopreno. Em algumas modalidades, a composição compreende mais ou cerca de 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 g de isopreno (p/p) da fração orgânica volátil da composição é isopreno.

Em algumas modalidades, a composição compreende mais ou cerca de 99,90, 99,92, 99,94, 99,96, 99,98, ou 100% de isopreno em peso quando comparado com o peso total de todos os hidrocarbonetos C5 em uma composição. Em algumas modalidades, a composição compreende menos ou cerca de 0,12, 0,10, 0,08, 0,06, 0,04, 0,02, 0,01, 0,005, 0,001, 0,0005, 0,0001, 0,00005, ou 0,00001% de hidrocarbonetos C5 diferentes de isopreno (como 1,3-ciclopentadieno, *trans*-1,3-pentadieno, *cis*-1,3-pentadieno, 1,4-pentadieno, 1-pentino, 2-pentino, 3-metil-1-butino, pent-4-ene-1-ino, *trans*-pent-3-ene-1-ino, *cis*-pent-3-ene-1-ino, 3-hexen-1-ol, acetato de 3-hexen-1-ila, limoneno, geraniol (trans-3,7-dimetil-2,6-octadien-1-ol) e citronelol (3,7-dimetil-6-octen-1-ol)) em peso quando comparado com o peso total

de todos os hidrocarbonetos C5 em uma composição. Em algumas modalidades, a composição possui menos ou cerca de 0,12, 0,10, 0,08, 0,06, 0,04, 0,02, 0,01, 0,005, 0,001, 0,0005, 0,0001, 0,00005, ou 0,00001% para 1,3-ciclopentadieno, *trans*-1,3-pentadieno, *cis*-1,3-pentadieno, 1,4-pentadieno, 1-pentino, 2-pentino, 3-metil-1-butino, pent-4-ene-1-ino, *trans*-pent-3-ene-1-ino, *cis*-pent-3-ene-1-ino, 3-hexen-1-ol, acetato de 3-hexen-1-ila, limoneno, geraniol (trans-3,7-dimetil-2,6-octadien-1-ol) e citronelol (3,7-dimetil-6-octen-1-ol) em peso quando comparado com o peso total de todos os hidrocarbonetos C5 em uma composição. Em modalidades específicas, a composição possui mais de cerca de 2 mg de isopreno e possui mais que ou cerca de 99,90, 99,92, 99,94, 99,96, 99,98, ou 100% de isopreno em peso quando comparado com o peso total de todos os hidrocarbonetos C5 em uma composição.

Em algumas modalidades, a composição possui menos ou cerca de 50, 40, 30, 20, 10, 5, 1, 0,5, 0,1, 0,05, 0,01, ou 0,005 ug/L de um composto que inibe a polimerização do isopreno para qualquer composto em uma composição que iniba a polimerização do isopreno. Em modalidades específicas, a composição também possui mais de cerca de 2 mg de isopreno.

Em algumas modalidades, a composição possui um ou mais compostos selecionados do grupo que consiste em etanol, acetona, alcoóis prenílicos C5 e compostos isoprenoides com 10 ou mais átomos de carbono. Em algumas modalidades, a composição possui mais ou cerca de 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100, ou 120 ug/L de etanol, acetona, álcool prenílico C5 (como 3-metil-3-buten-1-ol ou 3-metil-2-buten-1-ol), ou quaisquer dois ou mais dos precedentes. Em modalidades específicas, a composição possui mais de cerca de 2 mg de isopreno e possui um ou mais compostos selecionados a partir de grupo que consiste em etanol, acetona, alcoóis prenílicos C5 e compostos isoprenoides com 10 ou mais átomos de carbono.

Em algumas modalidades, a composição inclui isopreno e um ou mais segundos compostos selecionados do grupo que consiste em 2-heptanona, 6-metil-5-hepten-2-ona, 2,4,5-trimetilpiridina, 2,3,5-trimetilpirazina, citronelal, acetaldeído, metanotiol, acetato de metila, 1-propanol, diace-

tila, 2-butanona, 2-metil-3-buten-2-ol, acetato de etila, 2-metil-1-propanol, 3-metil-1-butanal, 3-metil-2-butanona, 1-butanol, 2-pentanona, 3-metil-1-butanol, isobutirato de etila, 3-metil-2-butenal, acetato de butila, acetato de 3-metilbutila, acetato de 3-metil-3-buten-1-ila, acetato de 3-metil-2-buten-1-ila, (E)-3,7-dimetil-1,3,6-octatrieno, (Z)-3,7-dimetil-1,3,6-octatrieno e 2,3-ciclo-heptenolpiridina. Em várias modalidades, a quantidade de um desses segundos componentes relativa à quantidade de isopreno em unidades de porcentagem por peso (isto é, o peso do componente dividido pelo peso de isopreno vezes 100) é maior que ou cerca de 0,01, 0,02, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, ou 110% (p/p).

Em algumas modalidades, a composição compreende (i) a fase gasosa que compreende isopreno e (ii) células em cultura que produzem mais de cerca de 400 nmol/g_{wcm}/h de isopreno. Em algumas modalidades, a composição compreende um sistema fechado e a fase gasosa compreende mais ou cerca de 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 ug/L de isopreno quando normalizada a 1 mL de 1 OD_{600} cultivada por 1 hora. Em algumas modalidades, a composição compreende um sistema aberto e a fase gasosa compreende mais ou cerca de 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 ug/L de isopreno quando difundido em uma taxa de 1 vvm. Em algumas modalidades, a fração orgânica volátil da fase gasosa compreende mais ou cerca de 99,90, 99,92, 99,94, 99,96, 99,98, ou 100% de isopreno por peso quando comparado com o peso total de todos os hidrocarbonetos C5 na fração orgânica volátil. Em algumas modalidades, a fração orgânica volátil da fase gasosa compreende menos ou cerca de 0,12, 0,10, 0,08, 0,06, 0,04, 0,02, 0,01, 0,005, 0,001, 0,0005, 0,0001, 0,00005, ou 0,00001% de hidrocarbonetos C5 diferentes de isopreno (como 1,3-ciclopentadieno, *trans*-1,3-pentadieno, *cis*-1,3-pentadieno, 1,4-pentadieno, 1-pentino, 2-pentino, 3-metil-1-butino, pent-4-ene-1-ino, *trans*-pent-3-ene-1-ino, *cis*-pent-3-ene-1-ino, 3-hexen-1-ol, acetato de 3-hexen-1-ila, limoneno, geraniol (trans-3,7-dimetil-2,6-octadien-1-ol) e citronelol (3,7-dimetil-6-octen-1-ol)) por peso quando comparado com o peso total de todos os hidrocarbonetos C5 na fração orgânica volátil. Em algumas modalidades, a fração orgânica volátil da

fase gasosa possui menos ou cerca de 0,12, 0,10, 0,08, 0,06, 0,04, 0,02, 0,01, 0,005, 0,001, 0,0005, 0,0001, 0,00005, ou 0,00001% para 1,3-ciclopentadieno, *trans*-1,3-pentadieno, *cis*-1,3-pentadieno, 1,4-pentadieno, 1-pentino, 2-pentino, 3-metil-1-butino, pent-4-ene-1-ino, *trans*-pent-3-ene-1-ino, *cis*-pent-3-ene-1-ino, 3-hexen-1-ol, acetato de 3-hexen-1-ila, limoneno, geraniol (trans-3,7-dimetil-2,6-octadien-1-ol) e citronelol (3,7-dimetil-6-octen-1-ol) por peso quando comparado com o peso total de todos os hidrocarbonetos C5 na fração orgânica volátil. Em modalidades específicas, a fração orgânica volátil da fase gasosa possui mais de cerca de 2 mg de isopreno e possui mais ou cerca de 99,90, 99,92, 99,94, 99,96, 99,98, ou 100% de isopreno por peso quando comparado com o peso total de todos os hidrocarbonetos C5 na fração orgânica volátil.

Em algumas modalidades, a fração orgânica volátil da fase gasosa possui menos ou cerca de 50, 40, 30, 20, 10, 5, 1, 0,5, 0,1, 0,05, 0,01, ou 0,005 ug/L de um composto que inibe a polimerização do isopreno para qualquer composição da fração orgânica volátil da fase gasosa que iniba a polimerização do isopreno. Em modalidades específicas, a fração orgânica volátil da fase gasosa também possui mais de cerca de 2 mg de isopreno.

Em algumas modalidades, a fração orgânica volátil da fase gasosa possui um ou mais compostos selecionados a partir de grupo que consiste em etanol, acetona, álcool prenílico C5 e compostos isoprenoides com 10 ou mais átomos de carbono. Em algumas modalidades, a fração orgânica volátil da fase gasosa possui mais ou cerca de 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100, ou 120 ug/L de etanol, acetona, álcool de prenila C5 (como 3-metil-3-buten-1-ol ou 3-metil-2-buten-1-ol), ou quaisquer dois ou mais dos precedentes. Em modalidades específicas, a fração orgânica volátil da fase gasosa possui mais de cerca de 2 mg de isopreno e possui um ou mais compostos selecionados a partir de grupo que consiste em etanol, acetona, álcool prenílico C5 e compostos isoprenoides com 10 ou mais átomos de carbono.

Em algumas modalidades, a fração orgânica volátil da fase gasosa possui a inclusão de isopreno e um ou mais segundos compostos sele-

cionados do grupo que consiste em 2-heptanona, 6-metil-5-hepten-2-ona, 2,4,5-trimetilpiridina, 2,3,5-trimetilpirazina, citronelal, acetaldeído, metanotiol, acetato de metila, 1-propanol, diacetila, 2-butanona, 2-metil-3-buten-2-ol, acetato de etila, 2-metil-1-propanol, 3-metil-1-butanal, 3-metil-2-butanona, 1-butanol, 2-pentanona, 3-metil-1-butanol, isobutirato de etila, 3-metil-2-butenal, acetato de butila, acetato de 3-metilbutila, acetato de 3-metil-3-buten-1-ila, acetato de 3-metil-2-buten-1-ila, (E)-3,7-dimetil-1,3,6-octatrieno, (Z)-3,7-dimetil-1,3,6-octatrieno e 2,3-ciclo-heptenolpiridina. Em várias modalidades, a quantidade de um desses segundos componentes relativo à quantidade de isopreno em unidades de porcentagem por peso (*isto é,* o peso do componente dividido pelo peso de isopreno vezes 100) é maior que ou cerca de 0,01, 0,02, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, ou 110% (p/p) em uma fração orgânica volátil da fase gasosa.

Em algumas modalidades de quaisquer das composições da invenção, pelo menos parte do isopreno está em uma fase gasosa. Em algumas modalidades, pelo menos parte do isopreno está em uma fase líquida (como um condensado). Em algumas modalidades, pelo menos parte do isopreno está em uma fase sólida. Em algumas modalidades, pelo menos parte do isopreno está adsorvido a um suporte sólido, como um suporte que inclui sílica e/ou carbono ativado. Em algumas modalidades, a composição inclui etanol. Em algumas modalidades, a composição inclui entre cerca de 75 a cerca de 90% em peso de etanol, como entre cerca de 75 a cerca de 80%, cerca de 80 a cerca de 85%, ou cerca de 85 a cerca de 90% por peso de etanol. Em algumas modalidades, a composição inclui entre cerca de 4 a cerca de 15% por peso de isopreno, como entre cerca de 4 a cerca de 8%, cerca de 8 a cerca de 12%, ou cerca de 12 a cerca de 15% por peso de isopreno.

Em algumas modalidades, a invenção também inclui sistemas que incluem quaisquer das células e/ou composições descritas neste. Em algumas modalidades, o sistema inclui um reator que contém câmara que compreende células em cultura que produzem mais de cerca de 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000, 1.250, 1.500, 1.750, 2.000, 2.500, 3.000, 4.000,

5.000, ou mais nmol/g_{wcm}/h de isopreno. Em algumas modalidades, o sistema não é um sistema fechado. Em algumas modalidades, pelo menos parte do isopreno é removida do sistema. Em algumas modalidades, o sistema inclui uma fase gasosa compreendendo isopreno. Em várias modalidades, a fase gasosa compreende quaisquer das composições descritas neste.

Sob um aspecto, a invenção fornece um pneu que compreende poli-isopreno. Em algumas modalidades, o poli-isopreno é produzido por (i) a polimerização de isopreno em quaisquer das composições descritas neste ou (ii) a polimerização de isopreno recuperada de quaisquer das composições descritas neste. Em algumas modalidades, o poli-isopreno compreende *cis*-1,4-poli-isopreno. Sob outro aspecto, a invenção fornece métodos de produção de pneu em que a melhoria compreende o uso de qualquer um ou mais das composições, células, sistemas e/ou métodos descritos neste para a produção de isopreno para a fabricação do pneu.

Em algumas modalidades de quaisquer das composições, sistemas e métodos da invenção, uma concentração não inflamável de isopreno em uma fase gasosa é produzida. Em algumas modalidades, a fase gasosa compreende menos de cerca de 9,5% (volume) de oxigênio. Em algumas modalidades, a fase gasosa compreende mais ou cerca de 9,5% (volume) de oxigênio e a concentração de isopreno em uma fase gasosa é menor que o limite de menor inflamabilidade ou maior que o limite de maior inflamabilidade. Em algumas modalidades, a parte da fase gasosa diferente de isopreno compreende entre cerca de 0% a cerca de 100% (volume) de oxigênio, como entre cerca de 10% a cerca de 100% (volume) de oxigênio. Em algumas modalidades, a parte da fase gasosa diferente de isopreno compreende entre cerca de 0% a cerca de 99% (volume) de nitrogênio. Em algumas modalidades, a parte da fase gasosa diferente de isopreno compreende entre cerca de 1% a cerca de 50% (volume) de CO_2.

Em algumas modalidades de quaisquer dos aspectos da invenção, as células em cultura produzem isopreno em mais que ou cerca de 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000, 1.250, 1.500, 1.750, 2.000, 2.500, 3.000, 4.000, 5.000, ou mais nmol/g_{wcm}/h de isopreno. Em algumas modalidades de

quaisquer dos aspectos da invenção, as células em cultura convertem mais que ou cerca de 0,002, 0,005, 0,01, 0,02, 0,05, 0,1, 0,12, 0,14, 0,16, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,2, 1,4, 1,6%, ou mais de carbono na célula em meio de cultura para isopreno. Em algumas modalidades de quaisquer dos aspectos da invenção, as células em cultura produzem isopreno em mais que ou cerca de 1, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000, 1.250, 1.500, 1.750, 2.000, 2.500, 3.000, 4.000, 5.000, 10.000, 100.000, ou mais ng de isopreno/gramas de células para o peso úmido das células/h ($ng/g_{wcm}/h$). Em algumas modalidades de quaisquer dos aspectos da invenção, as células em cultura produzem uma concentração cumulativa (quantidade total) de isopreno em mais que ou cerca de 1, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000, 1.250, 1.500, 1.750, 2.000, 2.500, 3.000, 4.000, 5.000, 10.000, 50.000, 100.000, ou mais mg de isopreno/L de caldo (mg/L_{caldo}, em que o volume de caldo inclui o volume das células e o meio das células). Outras taxas exemplares da produção de isopreno e da quantidade total de produção de isopreno são divulgadas neste.

Em algumas modalidades de quaisquer dos aspectos da invenção, as células também compreendem um ácido nucleico heterólogo codificando um polipeptídio de isopentenil-difosfato delta-isomerase (IDI). Em algumas modalidades de quaisquer dos aspectos da invenção, as células também compreendem uma inserção de cópia de um ácido nucleico endógeno codificando um polipeptídio IDI. Em algumas modalidades de quaisquer dos aspectos da invenção, as células também compreendem um ácido nucleico heterólogo codificando um polipeptídio de 1-desóxi-xilulose-5-fosfato sintase (DXS). Em algumas modalidades de quaisquer dos aspectos da invenção, as células também compreendem uma inserção de cópia de um ácido nucleico endógeno codificando um polipeptídio DXS. Em algumas modalidades de quaisquer dos aspectos da invenção, as células também compreendem um ou mais ácidos nucleicos codificando um polipeptídio IDI e um polipeptídio DXS. Em algumas modalidades de quaisquer dos aspectos da invenção, um ácido nucleico codifica o polipeptídio de isopreno sintase,

polipeptídio IDI e polipeptídio DXS. Em algumas modalidades de quaisquer dos aspectos da invenção, um vetor codifica o polipeptídio de isopreno sintase, polipeptídio IDI e polipeptídio DXS. Em algumas modalidades, o vetor compreende um marcador seletivo, como ácidos nucleicos de resistência antibiótica.

Em algumas modalidades de quaisquer dos aspectos da invenção, o ácido nucleico de isopreno sintase heterólogo e/ou o ácido nucleico de efe heterólogo é ligado de forma operacional a um promotor T7, como um promotor T7 contido em um meio ou plasmídeo de alta cópia. Em algumas modalidades de quaisquer dos aspectos da invenção, o ácido nucleico de isopreno sintase heterólogo ou o ácido nucleico de efe heterólogo é ligado de forma operacional a um promotor Trc, como um promotor Trc contido em um plasmídeo de média ou alta cópia. Em algumas modalidades de quaisquer dos aspectos da invenção, o ácido nucleico de isopreno sintase heterólogo ou o ácido nucleico de efe heterólogo é ligado de forma operacional a um promotor Lac, como um promotor Lac contido em plasmídeo de baixa cópia. Em algumas modalidades de quaisquer dos aspectos da invenção, o ácido nucleico de isopreno sintase heterólogo ou o ácido nucleico de efe heterólogo é ligado de forma operacional a um promotor endógeno, como um promotor endógeno de serina protease alcalina. Em algumas modalidades, o ácido nucleico de isopreno sintase heterólogo ou o ácido nucleico de efe heterólogo se integra a um cromossoma das células sem um marcador seletivo.

Em algumas modalidades, um ou mais entre ácidos nucleicos da via do MVA, IDI, via do DXP, efe, ou de isopreno sintase são colocados sob controle de um promotor ou fator que é mais ativo na fase estacionária do que na fase de crescimento. Por exemplo, um ou mais entre ácidos nucleicos da via do MVA, IDI, via do DXP, efe, ou de isopreno sintase podem ser colocados sob controle do fator sigma da fase estacionária, como RpoS. Em algumas modalidades, um ou mais entre ácidos nucleicos da via do MVA, IDI, via do DXP, efe, ou de isopreno sintase são colocados sob o controle de um promotor indutível na fase estacionária, como um promotor indutível por um regulador de resposta ativo em fase estacionária.

Em algumas modalidades de quaisquer dos aspectos da invenção, pelo menos uma parte das células mantém o ácido nucleico de isopreno sintase ou ácido nucleico de efe heterólogo por pelo menos ou cerca de 5, 10, 20, 40, 50, 60, 65, ou mais divisões celulares em uma cultura contínua (como a cultura contínua sem diluição). Em algumas modalidades de quaisquer dos aspectos da invenção, os ácidos nucleicos que compreendem o ácido nucleico de isopreno sintase, efe, IDI, ou DXS também compreendem um marcador seletivo, como ácidos nucleicos de resistência antibiótica.

Em algumas modalidades de quaisquer dos aspectos da invenção, as células também compreendem um ácido nucleico heterólogo codificando um polipeptídeo da via do MVA (como um polipeptídeo da via do MVA de *Saccharomyces cerevisiae ou Enterococcus faecalis*). Em uma modalidade, o polipeptídeo da via do mVA é mevalonato quinase. Em algumas modalidades de quaisquer dos aspectos da invenção, as células também compreendem uma inserção de cópia de um ácido nucleico endógeno codificando um polipeptídeo da via do MVA (como um polipeptídeo da via do MVA de *Saccharomyces cerevisiae ou Enterococcus faecalis*). Em algumas modalidades de quaisquer dos aspectos da invenção, as células compreendem ácido nucleico de isopreno sintase, DXS e de via do MVA. Em algumas modalidades de quaisquer dos aspectos da invenção, as células compreendem um ácido nucleico de isopreno sintase, um ácido nucleico de DXS, um ácido nucleico de IDI e um nucleico da via do MVA (adicionalmente ao ácido nucleico de IDI).

Em algumas modalidades de quaisquer dos aspectos da invenção, o polipeptídio de isopreno sintase é um polipeptídio de uma planta como *Pueraria* (por exemplo, *Pueraria montana ou Pueraria lobata*) ou *Populus* (por exemplo, *Populus tremuloides*, *Populus alba*, *Populus nigra*, *Populus trichocarpa*, ou o híbrido, *Populus alba x Populus tremula*). Em algumas modalidades de quaisquer dos aspectos da invenção, o efe é um polipeptídio de uma bactéria como *Pseudomonas* (por exemplo, *Pseudomonas syringae*).

Em algumas modalidades de quaisquer dos aspectos da invenção, as células são células bacterianas, como células bacterianas Gram-

positivas (por exemplo, células de *Bacillus* como células de *Bacillus subtilis* ou células de *Streptomyces* como células de *Streptomyces lividans*, *Streptomyces coelicolor*, ou *Streptomyces griseus*). Em algumas modalidades de quaisquer dos aspectos da invenção, as células são células bacterianas Gram-negativas (por exemplo, células de *Escherichia* como células de *Escherichia coli, Rhodopseudomonas sp.* como células de *Rhodopseudomonas palustris*, *Pseudomonas sp.* como células de *Pseudomonas fluorescens* ou células de *Pseudomonas putida,* ou células de *Pantoea* como células de *Pantoea citrea*). Em algumas modalidades de quaisquer dos aspectos da invenção, as células são de fungos, células como células de fungo filamentoso (por exemplo, células de *Trichoderma* como células de *Trichoderma reesei* ou células de *Aspergillus* como *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger*) ou células de levedura (por exemplo, células de *Yarrowia* como células de *Yarrowia lipolitica* ou células de *Saccharomyces* como *Saccharomyces cerevisiae*).

Em algumas modalidades de quaisquer dos aspectos da invenção, a fonte de carbono de polipeptídio microbiano inclui um ou mais polipeptídios de levedura ou bactérias. Em algumas modalidades de quaisquer dos aspectos da invenção, a fonte de carbono de polipeptídio vegetal inclui um ou mais polipeptídios de soja, milho, canola, jatropha, palmeira, amendoim, girassol, coco, mostarda, semente de colza, semente de algodão, semente de palmeira, azeitona, açafrão, gergelim ou linhaça.

Sob um aspecto, a invenção apresenta um produto produzido por quaisquer das composições ou métodos da invenção. Deve-se entender que uma, algumas ou toda as propriedades das várias modalidades aqui descritas podem ser combinadas para formar outras modalidades da presente invenção.

Os tópicos aqui fornecidos não são limitações dos vários aspectos ou modalidades da invenção que podem ser tomados como referência ao relatório descritivo como um todo.

Breve Descrição dos Desenhos

A figura 1 é a sequência nucleotídica de um gene de isopreno

sintase de kudzu de códon otimizado para expressão em *E. coli* (SEQ ID Nº: 1). O códon inicial ATG está em itálico, o códon final está em negrito e o sítio *Pst*I está sublinhado.

A figura 2 é um mapa de pTrcKudzu.

As figuras 3A-C são a sequência nucleotídica de pTrcKudzu (SEQ ID Nº: 2). O RBS está sublinhado, o códon inicial da isopreno sintase de kudzu está em maiúsculas e negrito e o códon final está em itálico, maiúsculas, negrito. O arcabouço de vetor é de pTrcHis2B.

A figura 4 é um mapa de pETNHisKudzu.

As figuras 5A-C são a sequência nucleotídica de pETNHisKudzu (SEQ ID Nº: 5).

A figura 6 é um mapa de pCL-lac-Kudzu.

As figuras 7A-C são a sequência nucleotídica de pCL-lac-Kudzu (SEQ ID Nº: 7).

A figura 8A é um gráfico apresentando a produção de isopreno em células de *E. coli* BL21 sem vetor.

A figura 8B é um gráfico apresentando a produção de isopreno em células de *E. coli* BL21 com pCL-lac-Kudzu

A figura 8C é um gráfico apresentando a produção de isopreno em células de *E. coli* BL21 com pTrcKudzu.

A figura 8D é um gráfico apresentando a produção de isopreno em células de *E. coli* BL21 com pETN-HisKudzu.

A figura 9A é um gráfico apresentando ao longo do tempo a OD da fermentação de *E. coli* BL21/pTrcKudzu em uma fermentação de 14 litros de batelada alimentada.

A figura 9B é um gráfico apresentando produção de isopreno ao longo do tempo da fermentação de *E. coli* BL21/pTrcKudzu em uma fermentação de 14 litros de batelada alimentada.

A figura 10A é um gráfico apresentando a produção de isopreno em *Pantoea citrea.* Células de controle sem isopreno sintase de kudzu recombinante. Losangos cinzas representam a síntese de isopreno, quadrados pretos representam a OD_{600}.

A figura 10B é um gráfico apresentando a produção de isopreno em *Pantoea citrea* expressando pCL-lac Kudzu. Losangos cinzas representam a síntese de isopreno, quadrados pretos representam aOD_{600}.

A figura 10C é um gráfico apresentando a produção de isopreno em *Pantoea citrea* expressando pTrcKudzu. Losangos cinzas representam a síntese de isopreno, quadrados pretos representam a OD_{600}.

A figura 11 é um gráfico apresentando a produção de isopreno em *Bacillus subtilis* expressando isopreno sintase recombinante. BG3594comK é uma cepa de *B. subtilis* sem plasmídeo (produção de isopreno nativa). CF443-BG3594comK é uma cepa de *B. subtilis* com pBSKudzu (produção de isopreno recombinante). IS no eixo y indica isopreno.

As figuras 12A-C são a sequência nucleotídica de pBS Kudzu #2 (SEQ ID Nº: 57).

A figura 13 é a sequência nucleotídica de isopreno sintase de kudzu com códon otimizado para expressão em *Yarrowia* (SEQ ID Nº: 8).

A figura 14 é um mapa de pTrex3g compreendendo um gene de isopreno sintase de kudzu com códon otimizado para expressão em *Yarrowia*.

As figuras 15A-C são a sequência nucleotídica do vetor pSPZ1(MAP29Spb) (SEQ ID Nº: 11).

A figura 16 é a sequência nucleotídica do gene de isopreno de kudzu (*Pueraria montana*) sintético com códon otimizado para expressão em *Yarrowia* (SEQ ID Nº: 12).

A figura 17 é a sequência nucleotídica do gene de isopreno sintase de álamo híbrido (*Populus alba x Populus tremula*) sintético (SEQ ID Nº: 13). O códon inicial ATG está em negrito e o códon final está sublinhado.

A figura 18A apresenta uma construção de esboço esquemático dos vetores pYLA 1, pYL1 e pYL2 (SEQ ID Nº: 79, 77, 76, 75, 74 e 73).

A figura 18B apresenta uma construção de esboço esquemático do vetor pYLA(POP1) (SEQ ID Nº: 72 e 73).

A figura 18C apresenta uma construção de esboço esquemático do vetor pYLA(KZ1) (SEQ ID Nº: 70 e 71).

A figura 18D apresenta uma construção de esboço esquemático do vetor pYLI(KZ1)

A figura 18E apresenta uma construção de esboço esquemático do vetor pYLI(MAP29)

A figura 18F apresenta uma construção de esboço esquemático do vetor pYLA(MAP29)

A figura 19A apresenta as vias metábolicas MVA e DXP para isopreno (com base em F. Bouvier *et al.*, Progress in Lipid Res. 44: 357-429, 2005). A seguinte descrição inclui nomes alternativos para cada polipeptídio nas vias e a referência que divulga um ensaio para a medição da atividade do polipeptídio indicado (cada uma dessas referências é incorporada neste por referência em sua totalidade, especificamente no que diz respeito a ensaios para a atividade de polipeptídios para polipeptídios nas via do MVA e DXP). **Via do mevalonato: AACT**; Acetil-CoA acetiltransferase, MvaE, EC 2.3.1.9. Ensaio: J. Bacteriol., 184: 2116–2122, 2002; **HMGS**; Hidroximetilglutaril-CoA sintase, MvaS, EC 2.3.3.10. Ensaio: J. Bacteriol., 184: 4065–4070, 2002; **HMGR**; 3-Hidróxi-3-metilglutaril-CoA redutase, MvaE, EC 1.1.1.34. Ensaio: J. Bacteriol., 184: 2116–2122, 2002; **MVK**; Mevalonato quinase, ERG12, EC 2.7.1.36. Ensaio: Curr Genet 19:9-14, 1991. **PMK**; Fosfomevalonato quinase, ERG8, EC 2.7.4.2, Ensaio: Mol Cell Biol., 11:620–631, 1991; **DPMDC**; Difosfomevalonato descarboxilase, MVD1, EC 4.1.1.33. Ensaio: Biochemistry, 33:13355-13362, 1994; **IDI**; Isopentenil-difosfato delta-isomerase, IDI1, EC 5.3.3.2. Ensaio: J. Biol. Chem. 264:19169-19175, 1989. **Via DXP: DXS**; 1-Desóxi-xilulose-5-fosfato sintase, dxs, EC 2.2.1.7. Ensaio: PNAS, 94:12857-62, 1997; **DXR**; 1-Desóxi-D-xilulose 5-fosfato redutoisomerase, dxr, EC 2.2.1.7. Ensaio: Eur. J. Biochem. 269:4446–4457, 2002; **MCT**; 4-Difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol sintase, IspD, EC 2.7.7.60. Ensaio: PNAS, 97: 6451–6456, 2000; **CMK**; 4-Difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol quinase, IspE, EC 2.7.1.148. Ensaio: PNAS, 97:1062-1067, 2000; **MCS**; 2C-Metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato sintase, IspF, EC 4.6.1.12. Ensaio: PNAS, 96:11758-11763, 1999; **HDS**; 1-Hidróxi-2-metil-2-(E)-butenil 4-difosfato sintase, ispG, EC 1.17.4.3. Ensaio: J. Org. Chem., 70:9168 -9174, 2005; **HDR**;

1-Hidróxi-2-metil-2-(E)-butenil 4-difosfato redutase, IspH, EC 1.17.1.2. Ensaio: JACS, 126:12847-12855, 2004.

A figura 19B ilustra as vias do MVA clássica e modificada. 1, acetil-CoA acetiltransferase (**AACT**); 2, HMG-CoA sintase (**HMGS**); 3, HMG-CoA redutase (**HMGR**); 4, mevalonato quinase **(MVK)**; 5, fosfomevalonato quinase (**PMK**); 6, difosfomevalonato descarboxilase **(MVD ou DPMDC)**; 7, isopentenil difosfato isomerase **(IDI)**; 8, fosfomevalonato descarboxilase **(PMDC)**; 9, isopentenil fosfato quinase **(IPK)**. A via do MVA clássica segue da reação 1 até a reação 7 através de reações 5 e 6, enquanto uma via do MVA modificada segue até as reações 8 e 9. P e PP na fórmula estrutural são fosfato e pirofosfato, respectivamente. Essa figura foi retirada de Koga e Morii, *Microbiology e Mol. Biology Reviews*, 71:97-120, 2007, que é incorporada por referência em sua totalidade, especificamente no que diz respeito aos ácidos nucleicos e polipeptídios da via do MVA modificada. A via do MVA modificada está presente, por exemplo, em alguns organismos de *Archaea*, como *Methanosarcina mazei.*

A figura 20 apresenta gráficos que representam os resultados da análise GC-MS de produção de isopreno por cepas de *Y. lipolitica* recombinante sem (esquerda) ou com (direita) um gene de isopreno sintase de kudzu. As setas indicam o tempo de eluição do padrão autêntico do isopreno.

A figura 21 é um mapa de pTrcKudzu yIDI DXS Kan.

As figuras 22A-D são a sequência nucleotídica de pTrcKudzu yIDI DXS Kan (SEQ ID Nº: 20).

A figura 23A é um gráfico apresentando a produção de isopreno a partir de glicose em BL21/pTrcKudzukan. Tempo 0 é o tempo de indução com IPTG (400 µmol). O eixo x é o tempo após a indução; o eixo y é a OD_{600} e o eixo y2 é a produtividade total de isopreno (µg/L de *headspace* ou produtividade específica (µg/L de *headspace*/OD). Os losangos representam OD_{600}, os círculos representam a produtividade total de isopreno (µg/L) e os quadrados representam a produtividade específica de isopreno (µg/L/OD).

A figura 23B é um gráfico apresentando a produção de isopreno de glicose em BL21/pTrcKudzu yIDI kan. Tempo 0 é o tempo de indução

com IPTG (400 µmol). O eixo x é o tempo após a indução; o eixo y é OD_{600} e o eixo y2 é a produtividade total de isopreno (µg/L de *headspace* ou produtividade específica (µg/L de *headspace*/OD). Os losangos representam OD_{600}, os círculos representam a produtividade total de isopreno (µg/L) e os quadrados representam produtividade específica de isopreno (µg/L/OD).

A figura 23C é um gráfico apresentando a produção de isopreno de glicose em BL21/pTrcKudzu DXS kan. Tempo 0 é o tempo de indução com IPTG (400 µmol). O eixo x é o tempo após a indução; o eixo y é OD_{600} e o eixo y2 é a produtividade total de isopreno (µg/L de *headspace* ou produtividade específica (µg/L de *headspace*/OD). Os losangos representam OD_{600}, os círculos representam a produtividade total de isopreno (µg/L) e os quadrados representam produtividade específica de isopreno (µg/L/OD).

A figura 23D é um gráfico apresentando a produção de isopreno de glicose em BL21/pTrcKudzu yIDI DXS kan. Tempo 0 é o tempo de indução com IPTG (400 µmol). O eixo x é o tempo após a indução; o eixo y é OD_{600} e o eixo y2 é a produtividade total de isopreno (µg/L de *headspace* ou produtividade específica (µg/L de *headspace*/OD). Os losangos representam OD_{600}, os círculos representam a produtividade total de isopreno (µg/L) e os quadrados representam produtividade específica de isopreno (µg/L/OD).

A figura 23E é um gráfico apresentando a produção de isopreno de glicose em BL21/pCL PtrcKudzu. Tempo 0 é o tempo de indução com IPTG (400 µmol). O eixo x é o tempo após a indução; o eixo y é OD_{600} e o eixo y2 é a produtividade total de isopreno (µg/L de *headspace* ou produtividade específica (µg/L de *headspace*/OD). Os losangos representam OD_{600}, os círculos representam a produtividade total de isopreno (µg/L) e os quadrados representam produtividade específica de isopreno (µg/L/OD).

A figura 23F é um gráfico apresentando a produção de isopreno de glicose em BL21/pCL PtrcKudzu yIDI. Tempo 0 é o tempo de indução com IPTG (400 µmol). O eixo x é o tempo após a indução; o eixo y é OD_{600} e o eixo y2 é a produtividade total de isopreno (µg/L de *headspace* ou produtividade específica (µg/L de *headspace*/OD). Os losangos representam OD_{600}, os círculos representam a produtividade total de isopreno (µg/L) e os qua-

drados representam produtividade específica de isopreno (µg/L/OD).

A figura 23G é um gráfico apresentando a produção de isopreno de glicose em BL21/pCL PtrcKudzu DXS. Tempo 0 é o tempo de indução com IPTG (400 µmol). O eixo x é o tempo após a indução; o eixo y é OD_{600} e o eixo y2 é a produtividade total de isopreno (µg/L de *headspace* ou produtividade específica (µg/L de *headspace*/OD). Os losangos representam OD_{600}, os círculos representam a produtividade total de isopreno (µg/L) e os quadrados representam produtividade específica de isopreno (µg/L/OD).

A figura 23H é um gráfico apresentando a produção de isopreno de glicose em BL21/pTrcKudzuIDIDXSkan. A seta indica o tempo de indução com IPTG (400 µmol). O eixo x é o tempo após a inoculação; o eixo y é OD600 e o eixo y2 é a produtividade total de isopreno (µg/L de *headspace* ou produtividade específica (µg/L de *headspace*/OD). Os losangos representam OD600, os triângulos representam a produtividade total de isopreno (µg/L) e os quadrados representam produtividade específica de isopreno (µg/L/OD).

A figura 24 é um mapa de pTrcKKDyIkIS kan.

As figuras 25A-D são a sequência nucleotídica de pTrcKKDyIkIS kan (SEQ ID Nº: 33).

A figura 26 é um mapa de pCL PtrcUpperPathway.

As figuras 27A-27D são uma sequência nucleotídica de pCL PtrcUpperPathway (SEQ ID Nº: 46).

A figura 28 apresenta um mapa do cassete contendo a via inferior do MVA e IDI de levedura para integração no cromossoma de *B. subtilis* no locus nprE. nprE a montante/a jusante indica 1 kb cada de sequência do locus nprE para integração. O promotor aprE (promotor de serina protease alcalina) indica o promotor (-35, -10, +1 sítio de início da transcrição, RBS) do gene *aprE*. MVK1 indica o gene de mevalonato quinase de levedura. RBS-PMK indica o gene de fosfomevalonato quinase de levedura com um sítio de início RBS de *Bacillus* a montante. RBS-MPD indica o gene de levedura difosfomevalonato descarboxilase com um sítio de início RBS de *Bacillus* a montante. RBS-IDI indica o gene IDI de levedura com um sítio de início

RBS de *Bacillus* a montante. Terminador indica o terminador da transcrição de serina protease alcalina de *B. amyliquefaciens*. SpecR indica o marcador de resistência à espectomicina. "nprE repetição a montante para amp." indica uma repetição direta da região a montante utilizada para amplificação.

As figuras 29A-D são uma sequência nucleotídica do cassete contendo a via inferior do MVA e IDI de levedura para integração no cromossoma de *B. subtilis* no locus *nprE* (SEQ ID Nº: 47).

A figura 30 é um mapa de p9796-poplar.

As figuras 31A e B são uma sequência nucleotídica de p9796-poplar (SEQ ID Nº: 48).

A figura 32 é um mapa de pTrcPoplar.

As figuras 33A-C são uma sequência nucleotídica de pTrcPoplar (SEQ ID Nº: 49).

A figura 34 é um mapa de pTrcKudzu yIDI Kan.

As figuras 35A-C são uma sequência nucleotídica de pTrcKudzu yIDI Kan (SEQ ID Nº: 50).

A figura 36 é um mapa de pTrcKudzuDXS Kan.

As figuras 37A-C são uma sequência nucleotídica de pTrcKudzuDXS Kan (SEQ ID Nº: 51).

A figura 38 é um mapa de pCL PtrcKudzu.

As figuras 39A-C são uma sequência nucleotídica de pCL PtrcKudzu (SEQ ID Nº: 52).

A figura 40 é um mapa de pCL PtrcKudzu A3.

As figuras 41A-C são uma sequência nucleotídica de pCL PtrcKudzu A3 (SEQ ID Nº: 53).

A figura 42 é um mapa de pCL PtrcKudzu yIDI.

As figuras 43A-C são uma sequência nucleotídica de pCL PtrcKudzu yIDI (SEQ ID Nº: 54).

A figura 44 é um mapa de pCL PtrcKudzu DXS.

As figuras 45A-D são uma sequência nucleotídica de pCL PtrcKudzu DXS (SEQ ID Nº: 55).

As figuras 46A-E apresentam gráficos que representam a produ-

ção de isopreno de matérias-primas de biomassa. O painel A apresenta a produção de isopreno a partir de palhas de milho, o painel B apresenta produção de isopreno a partir de bagaços, o painel C apresenta produção de isopreno a partir de polpa de celulose de madeira macia, o painel D apresenta produção de isopreno de glicose e o painel E apresenta produção de isopreno a partir de células sem matéria-prima adicional. Os quadrados cinza representam medidas de OD_{600} das culturas nos tempos indicados após a inoculação e os triângulos pretos representam a produção de isopreno nos tempos indicados após a inoculação.

A figura 47A apresenta um gráfico que representa a produção de isopreno por BL21(λDE3) pTrcKudzu yIDI DXS (kan) em uma cultura sem adição de glicose. Os quadrados representam OD_{600} e os triângulos representam o isopreno produzido (µg/mL).

A figura 47B apresenta um gráfico que representa a produção de isopreno a partir de 1% de açúcar invertido de matéria-prima de glicose por BL21(λDE3) pTrcKudzu yIDI DXS (kan). Os quadrados representam OD_{600} e os triângulos representam o isopreno produzido (µg/mL).

A figura 47C apresenta um gráfico que representa a produção de isopreno a partir de 1% de matéria-prima de açúcar invertido por BL21(λDE3) pTrcKudzu yIDI DXS (kan). Os quadrados representam OD_{600} e os triângulos representam o isopreno produzido (µg/mL).

A figura 47D apresenta um gráfico que representa a produção de isopreno a partir de 1% de matéria-prima de palhas de milho de AFEX por BL21(λDE3) pTrcKudzu yIDI DXS (kan). Os quadrados representam OD_{600} e os triângulos representam o isopreno produzido (µg/mL).

As figuras 48A-C apresentam gráficos que demonstram o efeito do extrato de levedura de produção de isopreno. O painel A apresenta a evolução ao longo do tempo da densidade ótica dentro de fermentadores alimentados com quantidades variadas do extrato de levedura. O painel B apresenta a evolução ao longo do tempo da concentração de isopreno dentro de fermentadores alimentados com quantidades variadas do extrato de levedura. A concentração é definida como uma quantidade de isopreno pro-

duzida por litro de caldo de fermentação. O painel C apresenta o efeito do extrato de levedura na produção de isopreno em *E. coli* cultivada em cultura de batelada alimentada.

As figuras 49A-C apresentam gráficos que demonstram a produção de isopreno a partir de um biorreator de 500 L com células de *E. coli* contendo um plasmídeo pTrcKudzu + yIDI + DXS. O painel A apresenta a evolução ao longo do tempo da densidade ótica dentro do biorreator de 500 L alimentado com glicose e extrato de levedura. O painel B apresenta a evolução ao longo do tempo da concentração de isopreno dentro do biorreator de 500 L alimentado com glicose e extrato de levedura. A concentração é definida como uma quantidade de isopreno produzido por litro de caldo de fermentação. O painel C apresenta a evolução ao longo do total de isopreno produzido a partir do biorreator de 500 L alimentado com glicose e extrato de levedura.

A figura 50 é um mapa de pJMuppervia2.

As figuras 51A-C são a sequência nucleotídica de pJMuppervia2 (SEQ ID Nº: 56).

A figura 52 é um mapa de pBS Kudzu #2.

A figura 53A é um gráfico apresentando o crescimento durante o tempo de fermentação de *Bacillus* expressando isopreno sintase de kudzu recombinante em fermentação de batelada alimentada de 14 litros. Os losangos pretos representam uma cepa controle (BG3594comK) sem isopreno sintase recombinante (produção de isopreno nativa) e os triângulos cinza representam *Bacillus* com pBSKudzu (produção de isopreno recombinante).

A figura 53B é um gráfico apresentando a produção de isopreno durante o tempo de fermentação de *Bacillus* expressando isopreno sintase de kudzu recombinante em fermentação de batelada alimentada de 14 litros. Os losangos pretos representam uma cepa controle (BG3594comK) sem isopreno sintase recombinante (produção de isopreno nativa) e os triângulos cinza representam *Bacillus* com pBSKudzu (produção de isopreno recombinante).

A figura 54 é a evolução ao longo do tempo da densidade ótica

dentro do biorreator de 15 L alimentado com glicose.

A figura 55 é a evolução ao longo do tempo de concentração de isopreno dentro do biorreator de 15 L alimentado com glicose. O título é definido como uma quantidade de isopreno produzida por litro de caldo de fermentação.

A figura 56 é a evolução ao longo do tempo do total de isopreno produzido a partir do biorreator de 15 L alimentado com glicose.

A figura 57 é a evolução ao longo do tempo da densidade ótica dentro do biorreator de 15 L alimentado com gicerol.

A figura 58 é a evolução ao longo do tempo de concentração de isopreno dentro do biorreator de 15 L alimentado com gicerol. O título é definido como uma quantidade de isopreno produzido por litro de caldo de fermentação.

A figura 59 é a evolução ao longo do tempo do total de isopreno produzido a partir do biorreator de 15 L alimentado com gicerol.

As figuras 60A-60C são as evoluções ao longo do tempo da densidade ótica, título de ácido mevalônico e produtividade específica dentro do biorreator de 150 L alimentado com glicose.

As figuras 61A-61C são as evoluções ao longo do tempo da densidade ótica, título de ácido mevalônico e produtividade específica dentro do biorreator de 15 L alimentado com glicose.

As figuras 62A-62C são as evoluções ao longo do tempo da densidade ótica, título de ácido mevalônico e produtividade específica dentro do biorreator de 15 L alimentado com glicose.

A figura 63A-63C são as evoluções ao longo do tempo da densidade ótica, título de isopreno e produtividade específica dentro do biorreator de 15 L alimentado com glicose.

As figuras 64A-64C são as evoluções ao longo do tempo da densidade ótica, título de isopreno e produtividade específica dentro do biorreator de 15 L alimentado com glicose.

As figuras 65A-65C são as evoluções ao longo do tempo da densidade ótica, título de isopreno e produtividade específica dentro do bior-

reator de 15 L alimentado com glicose.

As figuras 66A-66C são as evoluções ao longo do tempo da densidade ótica, título de isopreno e produtividade específica dentro do biorreator de 15 L alimentado com glicose.

A figura 67A-67C são as evoluções ao longo do tempo da densidade ótica, título de isopreno e produtividade específica dentro do biorreator de 15 L alimentado com glicose.

A figura 68 é um gráfico das temperaturas calculadas das chamas adiabáticas para a Série A como uma função da concentração do combustível para vários níveis de oxigênio. A legenda da figura lista as curvas na ordem em que aparecem em um gráfico. Por exemplo, a primeira entrada na legenda da figura (isopreno em ar em 40 C) corresponde a maior curva em um gráfico.

A figura 69 é um gráfico das temperaturas calculadas das chamas adiabáticas para a Série B como uma função da concentração do combustível para vários níveis de oxigênio com 4% de água. A legenda da figura lista as curvas na ordem em que aparecem em um gráfico.

A figura 70 é um gráfico das temperaturas calculadas das chamas adiabáticas para a Série C como uma função da concentração do combustível para vários níveis de oxigênio com 5% de CO_2. A legenda da figura lista as curvas na ordem em que aparecem em um gráfico.

A figura 71 é um gráfico das temperaturas calculadas das chamas adiabáticas para a Série D como uma função da concentração do combustível para vários níveis de oxigênio com 10% de CO_2. A legenda da figura lista as curvas na ordem em que aparecem em um gráfico.

A figura 72 é um gráfico das temperaturas calculadas das chamas adiabáticas para a Série E como uma função da concentração do combustível para vários níveis de oxigênio com 15% de CO_2. A legenda da figura lista as curvas na ordem em que aparecem em um gráfico.

A figura 73 é um gráfico das temperaturas calculadas das chamas adiabáticas para a Série F como uma função da concentração do combustível para vários níveis de oxigênio com 20% de CO_2. A legenda da figura

lista as curvas na ordem em que aparecem em um gráfico.

A figura 74 é um gráfico das temperaturas calculadas das chamas adiabáticas para a Série G como uma função da concentração do combustível para vários níveis de oxigênio com 30% de CO_2. A legenda da figura lista as curvas na ordem em que aparecem em um gráfico.

A figura 75A é uma tabela da conversão do Modelo CAFT com os resultados da porcentagem do peso à porcentagem do volume para a Série A.

A figura 75B é um gráfico da inflamabilidade com os resultados a partir do Modelo CAFT para a Série A com a figura 68 plotada como porcentagem de volume.

A figura 76A é uma tabela da conversão do Modelo CAFT com os resultados da porcentagem do peso à porcentagem do volume para a Série B.

A figura 76B é um gráfico da inflamabilidade com os resultados a partir do Modelo CAFT para a Série B com a figura 69 plotada como porcentagem de volume.

A figura 77 é uma figura dos vasos de testes de inflamabilidade.

A figura 78A é um gráfico da curva de inflamabilidade para a Série de Testes 1: 0% de Vapor, 0 Kg/cm^2 (0 psig) e 40°C.

A figura 78B é uma tabela que resume os pontos de dados da explosão e da não explosão para a Série de Testes 1.

A figura 78C é um gráfico da curva de inflamabilidade para a Série de Testes 1 comparado com o Modelo CAFT.

A figura 79A é um gráfico da curva de inflamabilidade para a Série de Testes 2: 4% de Vapor, 0 KG/cm^2 (0 psig) e 40°C.

A figura 79B é uma tabela que resume os pontos de dados da explosão e da não explosão para a Série de Testes 2.

A figura 79C é um gráfico da curva de inflamabilidade para a Série de Testes 2 comparado com o Modelo CAFT.

As figuras 80A e 80B são uma tabela das condições experimentais detalhadas e dos resultados para a Série de Testes 1.

A figura 81 é uma tabela das condições experimentais detalhadas e dos resultados para a Série de Testes 2.

A figura 82 é um gráfico da temperatura calculada das chamas adiabáticas plotado como uma função da concentração do fluido para várias razões de nitrogênio/oxigênio em 3 atmosferas de pressão.

A figura 83 é um gráfico da temperatura calculada das chamas adiabáticas plotado como uma função da concentração do fluido para várias razões de nitrogênio/oxigênio em 1 atmosfera de pressão.

A figura 84 é um gráfico da curva envelope da inflamabilidade construído com o uso de dados da figura 82 e seguindo a metodologia descrita no Exemplo 13. Os pontos de dados experimentais (os círculos) são de testes descritos neste que foram conduzidos em 1 pressão de sistema inicial de atmosfera.

A figura 85 é um gráfico da curva envelope da inflamabilidade construído com o uso de dados da figura 83 e seguindo a metodologia descrita no Exemplo 13. Os pontos dos dados experimentais (os círculos) são de testes descritos neste que foram conduzidos em 1 pressão de sistema inicial de atmosfera.

A figura 86A é um cromatograma GC/MS de gás de escape de fermentação.

A figura 86B é uma expansão da figura 86A para apresentar volatilidades menores presentes em gás de escape de fermentação.

A figura 87A é um cromatograma GC/MS de voláteis traços presentes em gás de escape seguido de retenção por criogenia em -78C.

A figura 87B é um cromatograma GC/MS de voláteis traços presentes em gás de escape seguido de retenção por criogenia em -196C.

A figura 87C é uma expansão da figura 87B.

A figura 87D é uma expansão da figura 87C.

As figuras 88A e 88B são cromatogramas GC/MS comparando hidrocarbonetos C5 de isopreno derivado de petróleo (figura 88A) e isopreno biologicamente produzido (figura 88B). O padrão contém três impurezas de hidrocarbonetos C5 eluindo em volta do pico principal de isopreno (figura

88A). Em contraste, o isopreno biologicamente produzido contém quantidades de etanol e acetona (tempo de execução de 3,41 minutos) (figura 88A).

A figura 89 é um gráfico da análise de gás de escape de fermentação de uma cepa de *E. coli* BL21(DE3) pTrcIS expressando uma isopreno sintase de kudzu e alimentadas com glicose com 3 g/L de extrato de levedura.

A figura 90 apresenta as estruturas de várias impurezas que são estruturalmente similares ao isopreno e podem também agir como venenos de catalisador de polimerização.

A figura 91 é um mapa de pTrcHis2AUpperVia (também chamado de pTrcUpperMVA).

As figuras 92A-92C são a sequência nucleotídica de pTrcHis2AUpperVia (também chamado de pTrcUpperMVA) (SEQ ID Nº: 86).

A figura 93 é a evolução ao longo do tempo da densidade ótica dentro do biorreator de 15 L alimentado com glicose.

A figura 94 é a evolução ao longo do tempo do título de isopreno dentro do biorreator de 15 L alimentado com glicose. A concentração é definida como uma quantidade de isopreno produzida por litro de caldo de fermentação.

A figura 95 é a evolução ao longo do tempo do total de isopreno produzido a partir do biorreator de 15 L alimentado com glicose.

A figura 96 é a evolução ao longo do tempo da densidade ótica dentro do biorreator de 15 L alimentado com açúcar invertido.

A figura 97 é a evolução ao longo do tempo do título de isopreno dentro do biorreator de 15 L alimentado com açúcar invertido. A concentração é definida como uma quantidade de isopreno produzida por litro de caldo de fermentação.

A figura 98 é a evolução ao longo do tempo do total de isopreno produzido a partir do biorreator de 15 L alimentado com açúcar invertido.

A figura 99 é a evolução ao longo do tempo de densidade ótica dentro do biorreator de 15 L alimentado com glicose.

A figura 100 é a evolução ao longo do tempo do título de isopre-

no dentro do biorreator de 15 L alimentado com glicose. A concentração é definida como uma quantidade de isopreno produzido por litro de caldo de fermentação.

A figura 101 é a evolução ao longo do tempo de atividade específica de isopreno a partir do biorreator de 15 L alimentado com glicose.

A figura 102 é um mapa de pCLPtrcUpperPathwayHGS2.

As figuras 103A-103C são a sequência nucleotídica da pCLPtrcUpperPathwayHGS2 (SEQ ID Nº: 87).

A figura 104 é a evolução ao longo do tempo da densidade ótica dentro do biorreator de 15 L alimentado com glicose.

A figura 105 é a evolução ao longo do tempo do título de isopreno dentro do biorreator de 15 L alimentado com glicose. A concentração é definida como uma quantidade de isopreno produzido por litro de caldo de fermentação.

A figura 106 é a evolução ao longo do tempo do total de isopreno produzido a partir do biorreator de 15 L alimentado com glicose.

A figura 107 é um mapa de plasmídeo MCM330.

As figuras 108A-108C são a sequência nucleotídica do plasmídeo MCM330 (SEQ ID Nº: 90).

A figura 109 é um mapa de pET24D-Kudzu.

As figuras 110A e 110B são a sequência nucleotídica de pET24D-Kudzu (SEQ ID Nº: 101).

A figura 111A é a evolução ao longo do tempo da densidade ótica dentro do biorreator de 15 L alimentado com glicose. A figura 111B é a evolução ao longo do tempo do título de isopreno dentro do biorreator de 15 L alimentado com glicose. A concentração é definida como uma quantidade de isopreno produzido por litro de caldo de fermentação. A figura 111C é a evolução ao longo do tempo da produtividade específica de isopreno na biorreator de 15 L alimentado com glicose.

A figura 112A é um mapa do operon da Via Inferior da *Archaea M. mazei*.

As figuras 112B e 112C são a sequência do operon da Via infe-

rior da *Archaea M. mazei* (SEQ ID Nº: 102).

A figura 113A é um mapa de MCM382 – pTrcKudzuMVK(mazei).

As figuras 113B e 113C são a sequência nucleotídica de MCM382 – pTrcKudzuMVK(mazei) (SEQ ID Nº: 103).

A figura 114A é um mapa de MCM376 - MVK de Lowerin pET200D da *Archaea M. mazei.*

As figuras 114B e 114C são a sequência nucleotídica de MCM376 - MVK de Lowerin pET200D da *Archaea M. mazei* (SEQ ID Nº: 108).

As figuras 115A-115D demonstram que a superexpressão de MVK e isopreno quinase resulta em aumento da produção de isopreno. Isopreno e CO_2 acumulados a partir de MCM401 e MCM343 durante o crescimento em glicose em biorreatores de 100mL com indução de IPTG a 100 e 200uM de produção de isopreno foram medidos por no decurso de 22 horas. A figura 115A é um gráfico do isopreno acumulado (%) de MCM343. A figura 115B é um gráfico do isopreno acumulado (%) de MCM401. A figura 115C é um gráfico do CO_2 acumulado (%) de MCM 401.

A figura 116 é uma evolução ao longo do tempo da densidade ótica dentro do biorreator de 15 L alimentado com glicose.

A figura 117 é uma evolução ao longo do tempo do título de isopreno dentro do biorreator de 15 L alimentado com glicose. O título é definido como uma quantidade de isopreno produzida por litro de caldo de fermentação.

A figura 118 é uma evolução ao longo do tempo do total de isopreno produzido a partir do biorreator de 15 L alimentado com glicose.

A figura 119 é um gráfico da taxa de evolução de dióxido de carbono total (TCER), ou perfil de atividade metabólica, dentro do biorreator de 15 L alimentado com glicose.

A figura 120 é um gráfico da viabilidade celular durante a produção de isopreno dentro do biorreator de 15 L alimentado com glicose. TVC/OD é a contagem viável total (unidades formadoras de colônia) em 1 mL de caldo por unidade de densidade ótica (OD_{550}).

A figura 121 é uma evolução ao longo do tempo da densidade ótica dentro do biorreator de 15 L alimentado com glicose.

A figura 122 é uma evolução ao longo do tempo do título de isopreno dentro do biorreator de 15 L alimentado com glicose. O título é definido como uma quantidade de isopreno produzida por litro de caldo de fermentação.

A figura 123 é uma evolução ao longo do tempo do total de isopreno produzido a partir do biorreator de 15 L alimentado com glicose.

A figura 124 é uma evolução ao longo do tempo de produtividade volumétrica dentro do biorreator de 15 L alimentado com glicose. A produtividade volumétrica é definida como a quantidade de isopreno produzido por litro de caldo por hora.

A figura 125 é uma evolução ao longo do tempo de rendimento instantâneo dentro do biorreator de 15 L alimentado com glicose. O rendimento instantâneo é definido como a quantidade de isopreno (grama) produzido por quantidade de glicose (grama) alimentada no biorreator (p/p) durante o intervalo de tempo entre os pontos de dados.

A figura 126 é um gráfico da taxa de evolução de dióxido de carbono total (TCER), ou perfil de atividade metabólica, dentro do biorreator de 15 L alimentado com glicose.

A figura 127 é viabilidade celular durante a produção de isopreno dentro do biorreator de 15 L alimentado com glicose. TVC/OD é a contagem viável total (unidades formadoras de colônia) em 1 mL de caldo por unidade de densidade ótica (OD_{550}).

A figura 128 é uma evolução ao longo do tempo de densidade ótica dentro do biorreator de 15 L alimentado com glicose.

A figura 129 é uma evolução ao longo do tempo do título de isopreno dentro do biorreator de 15 L alimentado com glicose. O título é definido como uma quantidade de isopreno produzida por litro de caldo de fermentação.

A figura 130 é uma evolução ao longo do tempo do total de isopreno produzido a partir do biorreator de 15 L alimentado com glicose.

A figura 131 é um gráfico da taxa de evolução de dióxido de carbono total (TCER), ou perfil de atividade metabólica, dentro do biorreator de 15 L alimentado com glicose.

A figura 132 é um gráfico mostrando que uma diminuição transiente no fluxo de ar para o biorreator causou um pico na concentração de isopreno no gás de escape que não causou uma diminuição dramática na atividade metabólica (TCER). TCER, ou atividade metabólica, é a taxa de evolução de dióxido de carbono total.

A figura 133 é um gráfico da viabilidade celular durante a produção de isopreno dentro do biorreator de 15 L alimentado com glicose. TVC/OD é a contagem viável total (unidades formadoras de colônia) em 1 mL de caldo por unidade de densidade ótica (OD_{550}).

A figura 134 é uma evolução ao longo do tempo da densidade ótica dentro do biorreator de 15 L alimentado com glicose. Linhas verticais pontilhadas denotam o intervalo de tempo quando o isopreno foi introduzido no biorreator em uma taxa de 1 g/L/h.

A figura 135 é a taxa de evolução de dióxido de carbono total (TCER), ou perfil de atividade metabólica, dentro do biorreator de 15 L alimentado com glicose. Linhas verticais pontilhadas denotam o intervalo de tempo quando o isopreno foi introduzido no biorreator em uma taxa de 1 g/L/h.

A figura 136 é a viabilidade celular durante a produção de isopreno dentro do biorreator de 15 L alimentado com glicose. TVC/OD é a contagem viável total (unidades formadoras de colônia) em 1 mL de caldo por unidade de densidade ótica (OD_{550}). Linhas verticais pontilhadas denotam o intervalo de tempo quando o isopreno foi introduzido no biorreator em uma taxa de 1 g/L/h.

As figuras 137A e B são a sequência do gene da isopreno sintase de pET24a de *Populus alba* realçado em negrito (SEQ ID Nº: 109).

As figuras 137C e D são a sequência do gene da isopreno sintase de pET24a de *Populus nigra* realçado em negrito (SEQ ID Nº: 110).

As figuras 137E e F são a sequência de pET24a de *Populus*

tremuloides (SEQ ID Nº: 123).

A figura 137G é a sequência de aminoácidos do gene da isopreno sintase de *Populus tremuloides* (SEQ ID Nº: 124).

As figuras 137H e I são a sequência de *Populus trichocarpa* pET24a: gene da isopreno sintase realçado em negrito (SEQ ID Nº: 111).

As figuras 137J e K são a sequência de *Populus tremula x Populus alba* pET24a: gene da isopreno sintase realçado em negrito (SEQ ID Nº: 112).

A figura 137L é um mapa de MCM93 que contém a sequência codificante de IspS de kudzu em um arcabouço de pCR2.1.

As figuras 137M e N são a sequência de MCM93 (SEQ ID Nº: 113).

A figura 137O é um mapa de pET24D-Kudzu.

As figuras 137P e Q são a sequência de pET24D-Kudzu (SEQ ID Nº: 114).

A figura 138 são dados de expressão de isopreno sintase para várias espécies de álamo como medido no ensaio *head space* de célula inteira. O eixo Y é ug/L/OD de isopreno produzido por 0,2 mL de uma cultura induzida com IPTG.

A figura 139 é a atividade relativa de enzimas isopreno sintase de álamo como medido pelo ensaio de DMAPP. Enzimas de álamo têm atividade significativamente maior que a isopreno sintase de kudzu. O álamo [*alba x tremula*] teve apenas traços (<1%) de atividade e não é mostrado na plotagem.

A figura 140 é um mapa de pDONR221:19430 – hybrid_HGS.

A figura 141 é a sequência nucleotídica de pDONR221:19430 – hybrid_HGS, a sequência da isopreno sintase de kudzu com códon otimizado para levedura (SEQ ID Nº: 115).

A figura 142A é um mapa de pDW14.

As figuras 142B e C são a sequência nucleotídica completa de pDW14 (SEQ ID Nº: 119).

A figura 143 mostra cepas de INVSc-1 induzidas contendo

pDW14 ou pYES-DEST52. figura 143A. Um gel de bis tris de 4-12% (Novex, Invitrogen) de lisados gerados das cepas de INVSc-a induzidas com galactose e coradas com SimplyBlue SafeStain (Invitrogen). figura 143B. Análise por western blot das mesmas cepas usando o kit WesternBreeze (Invitrogen). As raias são como se segue: 1, INVSc-1 + pYES-DEST52; 2, INVSc-1 + pDW14 (isolado 1); e 3, INVSc-1 + pDW14 (isolado 2). O PM (em kDa) é indicado (usando o padrão de peso molecular SeeBlue Plus-2.

A figura 144 mostra cepas de INVSc-1 induzidas contendo pDW14 ou pYES-DEST52. figura 144A. OD_{600} de cepas induzidas com galactose antes da lise. O eixo y é a OD_{600}. figura 144B. Ensaio de DMAPP de *headspace* de isopreno sintase em cepas controle e contendo isopreno sintase. A atividade específica foi calculada como µg de HG/L/OD. As amostras são como se segue: Controle, INVSc-1 + pYES-DEST52; HGS-1, INVSc-1 + pDW14 (isolado 1); HGS-2, INVSc-1 + pDW14 (isolado 2).

A figura 145A é um mapa de isopreno sintase fluo-opt2v2 com códon otimizado.

A figura 145B é a sequência nucleotídica de isopreno sintase fluo-opt2v2 com códon otimizado (SEQ ID Nº: 120).

A figura 146A é um mapa de pBBR1MCS5.

As figuras 146B e C são a sequência nucleotídica de pBBR1MCS5 (SEQ ID Nº: 121).

A figura 147A é um mapa de pBBR5HGSOpt2_2.

As figuras 147B e C são a sequência nucleotídica de pBBR5HGSOpt2_2 (SEQ ID Nº: 122).

A figura 148 é um gráfico de CER contra tempo de fermentação para a cepa MCM401, não induzida, induzida com IPTG (4 x 50 µmol) ou IPTG (2 x 100µmol).

A figura 149 mostra a concentração de glicose em soluções de cana-de-açúcar, pH ajustado ou não, como uma função do número de ciclos de autoclavagem (um ciclo = 30 min).

A figura 150 mostra curvas de crescimento (OD_{600} como uma função do tempo) de *Pseudomonas putida* F1 e *Pseudomonas fluorescens*

ATCC13525 em glicose, cana-de-açúcar e açúcar de cana invertido.

A figura 151 mostra curvas de crescimento (OD_{600} como uma função do tempo) de *E. coli* BL21(DE3), MG1655, ATCC11303 e B REL 606 em glicose, cana-de-açúcar e açúcar de cana invertido.

A figura 152A mostra o mapa plasmidial de pCR-blunt_Pffe-efe.

As figuras 152B mostra a sequência de ácidos nucleicos de p-CR-blunt_Pffe-efe (SEQ ID Nº: 125).

A figura 153 mostra a produção de etileno por 5 mL de caldo de *E. coli* DH5α, pCRblunt-Pffh-efe na OD 0,23 incubado em um frasco *headspace* de 20 mL.

A figura 154 mostra a produção de etileno por 1 mL de caldo de *E. coli* DH5α, pCRblunt-Pffh-efe na OD 0,23 incubado em um frasco *headspace* de 20 mL.

A figura 155 mostra a produção de etileno por 5 mL de caldo de *E. coli* DH5α, pCRblunt-Pffh-efe na OD 0,45 incubado em um frasco *headspace* de 20 mL.

Descrição Detalhada da Invenção

A presente invenção fornece, *inter alia*, composições, sistemas, células e métodos para a produção de um composto com um ou ambos das seguintes características: (a) um coeficiente da lei de Henry inferior a cerca de 250M/atm e/ou (b) uma solubilidade em água de menos de cerca de 100 g/L. Em uma modalidade, o composto é isopreno. Em outra modalidade, o composto é etileno. A invenção caracteriza métodos para a produção de isopreno pelo cultivo de células sob condições adequadas para a produção de isopreno ao mesmo tempo em que é mantida a viabilidade celular e/ou atividade metabólica como indicado pela taxa de evolução de dióxido de carbono ou taxa de evolução de dióxido de carbono total. Taxa de evolução de dióxido de carbono (CER) e taxa de evolução de dióxido de carbono total (CER total) são termos bem-conhecidos por alguém versado na técnica da fermentação e comumente se referem ao dióxido de carbono desenvolvido pela cultura (por exemplo, mmol/L/h).

Adicionalmente, sob alguns aspectos, a invenção caracteriza

métodos para a produção de isopreno pelo cultivo de células sob condições adequadas para a produção de isopreno com isopreno concentrado na fase gasosa usando taxas de pulverização de gás reduzidas ou sem pulverização de gás. Sob alguns aspectos, a invenção também caracteriza métodos para a produção de um composto com um coeficiente da lei de Henry inferior a cerca de 250M/atm e/ou baixa solubilidade em água (alta insolubilidade em água). Sob alguns aspectos, a invenção também caracteriza método para a produção de etileno.

Salvo definição em contrário, os significados de todos os termos técnicos e científicos aqui utilizados são aqueles comumente entendidos por alguém versado na técnica à qual esta invenção pertence. Singleton, *et al.*, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York (1994) e Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology, Harper Perennial, N.Y. (1991) fornecem alguém versado na técnica com um dicionário geral de muitos dos termos utilizados nesta invenção. Deve-se entender que esta invenção não está limitada aos reagentes, protocolos e metodologia particular descritos, já que estes podem variar. Alguém versado na técnica também apreciará que quaisquer métodos e materiais similares ou equivalentes àqueles descritos aqui também podem ser usados para praticar ou testar a invenção.

Para utilização aqui, salvo clara indicação em contrário, o uso dos termos "um", "uma" e semelhantes se refere a um(a) ou mais.

Referência a "cerca de" um valor ou parâmetro aqui inclui (e descreve) modalidades que são direcionadas àquele valor ou parâmetro por si. Por exemplo, descrição que se refere a "cerca de X" inclui a descrição de "X". Intervalos numéricos incluem os números que definem o intervalo.

Entende-se que aspectos e modalidades da invenção aqui descrita incluem "compreender", "consistir" e "consistir essencialmente em" aspectos e modalidades.

Viabilidade Celular em Título de Isopreno Alto

O isopreno é uma molécula hidrofóbica secretada por muitas plantas, animais e micróbios. Bactérias, como *Bacillus*, produzem isopreno

em níveis razoavelmente baixos. Embora haja alguma evidência de que plantas secretem isopreno para auxiliar a termoproteção, foi levantada a hipótese de que o isopreno pode agir antagonicamente para cianobactérias e fungos, ou como um agente antimicrobiano. Veja, por exemplo, Ladygina et al., *Process Biochemistry* 41:1001-1014 (2006), que foi incorporada como referência em sua totalidade, particularmente com relação à ação antagônica do isopreno. Já que os níveis de produção muito baixos que ocorrem na natureza são suficientes para serem antimicrobianos, era de grande interesse que os títulos e níveis de produtividade de isopreno necessários para a comercialização de isopreno matassem o micróbio hospedeiro.

Encontra-se métodos para produzir títulos e níveis de produtividade de isopreno para a comercialização de isopreno ao mesmo tempo que se mantinha a viabilidade celular e/ou atividade metabólica como indicado pela taxa de evolução de dióxido de carbono ou taxa de evolução de dióxido de carbono total.

São fornecidos aqui métodos para produzir isopreno compreendendo: a) a cultura de células sob condições adequadas para a produção de isopreno; e b) a produção de isopreno, em que as células produzem mais de cerca de 400 nmol/g_{wcm}/h de isopreno e a taxa de evolução de dióxido de carbono das células é maior que cerca de 1 x 10^{-18}mmol/L/hora. Em algumas modalidades, o isopreno produzido está em qualquer concentração ou quantidade divulgada na seção intitulada "Produção Exemplar de Isopreno". Em algumas modalidades, a quantidade de isopreno está entre cerca de qualquer dentre 400 nmol/g_{wcm}/hora e 1 mol/g_{wcm}/hora, 400 nmol/g_{wcm}/hora e 1 mmol/g_{wcm}/hora, 400 nmol/g_{wcm}/hora e 40 mmol/g_{wcm}/hora, 400 nmol/g_{wcm}/hora e 4 mmol/g_{wcm}/hora, 1 mmol/g_{wcm}/hora e 1,5 mmol/g_{wcm}/hora, 1,5 mmol/g_{wcm}/hora e 3 mmol/g_{wcm}/hora, 3 mmol/g_{wcm}/hora e 5 mmol/g_{wcm}/hora, 5 mmol/g_{wcm}/hora e 25 mmol/g_{wcm}/hora, 25 mmol/g_{wcm}/hora e 100 mmol/g_{wcm}/hora, 100 mmol/g_{wcm}/hora e 500 mmol/g_{wcm}/hora, ou 500 mmol/g_{wcm}/hora e 1000 mmol/g_{wcm}/hora. Em algumas modalidades, a quantidade de isopreno é cerca de qualquer dentre 1 mmol/g_{wcm}/hora, 1,5 mmol/g_{wcm}/hora, 2 mmol/g_{wcm}/hora, 3 mmol/g_{wcm}/hora, 4 mmol/g_{wcm}/hora, ou

5 $mmol/g_{wcm}$/hora. Em algumas modalidades, a taxa de evolução de dióxido de carbono entre cerca de qualquer dentre1 x 10^{-18} mmol/L/hora e cerca de 1 mol/L/hora, 1 mmol/L/hora e 1 mol/L/hora, 25 mmol/L/hora e 750 mmol/L/hora, 25 mmol/L/hora e 75 mmol/L/hora, 250 mmol/L/hora e 750 mmol/L/hora, ou 450 mmol/L/hora e 550 mmol/L/hora. Em algumas modalidades, a taxa de evolução de dióxido de carbono é cerca de qualquer dentre 50 mmol/L/hora, 100 mmol/L/hora, 150 mmol/L/hora, 200 mmol/L/hora, 250 mmol/L/hora, 300 mmol/L/hora, 350 mmol/L/hora, 400 mmol/L/hora, 450 mmol/L/hora, ou 500 mmol/L/hora.

Também são fornecidos aqui métodos para produzir isopreno compreendendo: a) a cultura de células sob condições adequadas para a produção de isopreno; e b) a produção de isopreno,em que as células produzem mais de cerca de 400 $nmol/g_{wcm}$/hora de isopreno e a viabilidade celular é reduzida a menos que cerca de duas vezes. Em algumas modalidades, o isopreno produzido está em qualquer concentração ou quantidade divulgada na seção intitulada "Produção Exemplar de Isopreno". Em algumas modalidades, a quantidade de isopreno está entre cerca de qualquer dentre 400 $nmol/g_{wcm}$/hora e 1 mol/g_{wcm}/hora, 400 $nmol/g_{wcm}$/hora e 1 $mmol/g_{wcm}$/hora, 400 $nmol/g_{wcm}$/hora e 40 $mmol/g_{wcm}$/hora, 400 $nmol/g_{wcm}$/hora e 4 $mmol/g_{wcm}$/hora, 1 $mmol/g_{wcm}$/hora e 1,5 $mmol/g_{wcm}$/hora, 1,5 $mmol/g_{wcm}$/hora e 3 $mmol/g_{wcm}$/hora, 3 $mmol/g_{wcm}$/hora e 5 $mmol/g_{wcm}$/hora, 5 $mmol/g_{wcm}$/hora e 25 $mmol/g_{wcm}$/hora, 25 $mmol/g_{wcm}$/hora e 100 $mmol/g_{wcm}$/hora, 100 $mmol/g_{wcm}$/hora e 500 $mmol/g_{wcm}$/hora, ou 500 $mmol/g_{wcm}$/hora e 1000 $mmol/g_{wcm}$/hora. Em algumas modalidades, a quantidade de isopreno é cerca de qualquer dentre 1 $mmol/g_{wcm}$/hora, 1,5 $mmol/g_{wcm}$/hora, 2 $mmol/g_{wcm}$/hora, 3 $mmol/g_{wcm}$/hora, 4 $mmol/g_{wcm}$/hora, ou 5 $mmol/g_{wcm}$/hora. Em algumas modalidades, a viabilidade celular é reduzida a menos que cerca de qualquer dentre 1,75 vezes, 1,5 vezes, 1,25 vezes, 1 vez, 0,75 vezes, 0,5 vezes, ou 0,25 vezes. Em algumas modalidades, a viabiliade celular é reduzida a cerca de 2 vezes.

São adicionalmente fornecidos aqui métodos para produzir isopreno compreendendo: a) a cultura de células sob condições adequadas

para a produção de isopreno; e b) a produção de isopreno, em que a produtividade total cumulativa do isopreno produzido pelas células em cultura é maior que cerca de 0,2 mg/L_{caldo}/hora e a taxa de evolução de dióxido de carbono das células é maior que cerca de 1 x 10^{-18}mmol/L/hora. Em algumas modalidades, a produtividade total cumulativa do isopreno é qualquer concentração ou quantidade divulgada na seção intitulada "Produção Exemplar de Isopreno". Em algumas modalidades, a produtividade total cumulativa do isopreno está entre cerca de qualquer dentre 0,2 mg/L_{caldo}/hora e 5 g/L_{caldo}/hora, 0,2 mg/L_{caldo}/hora e 1 g/L_{caldo}/hora, 1 g/L_{caldo}/hora e 2,5 g/L_{caldo}/hora, 2,5 g/L_{caldo}/hora e 5 g/L_{caldo}/hora. Em algumas modalidades, a taxa de evolução de dióxido de carbono está entre cerca de qualquer dentre 1 x 10^{-18} mmol/L/hora e cerca de 1 mol/L/hora, 1 mmol/L/hora e 1 mol/L/hora, 25 mmol/L/hora e 750 mmol/L/hora, 25 mmol/L/hora e 75 mmol/L/hora, 250 mmol/L/hora e 750 mmol/L/hora, ou 450 mmol/L/hora e 550 mmol/L/hora. Em algumas modalidades, a taxa de evolução de dióxido de carbono é cerca de qualquer dentre 50 mmol/L/hora, 100 mmol/L/hora, 150 mmol/L/hora, 200 mmol/L/hora, 250 mmol/L/hora, 300 mmol/L/hora, 350 mmol/L/hora, 400 mmol/L/hora, 450 mmol/L/hora, or 500 mmol/L/hora.

São fornecidos aqui métodos para produzir isopreno compreendendo: a) a cultura de células sob condições adequadas para a produção de isopreno; e b) a produção de isopreno, em que a produtividade total cumulativa do isopreno produzido pelas células em cultura é maior que cerca de 0,2 mg/L_{caldo}/hora e a viabilidade celular é reduzida a menos que cerca de duas vezes. Em algumas modalidades, a produtividade total cumulativa do isopreno é qualquer concentração ou quantidade divulgada na seção intitulada "Produção Exemplar de Isopreno". Em algumas modalidades, a produtividade total cumulativa do isopreno está entre cerca de qualquer dentre 0,2 mg/L_{caldo}/hora e 5 g/L_{caldo}/hora, 0,2 mg/L_{caldo}/hora e 1 g/L_{caldo}/hora, 1 g/L_{caldo}/hora e 2,5 g/L_{caldo}/hora, 2,5 g/L_{caldo}/hora e 5 g/L_{caldo}/hora. Em algumas modalidades, a viabilidade celular é reduzida a menos que cerca de qualquer dentre 1,75 vezes, 1,5 vezes, 1,25 vezes, 1 vez, 0,75 vezes, 0,5 vezes, ou 0,25 vezes.

Também são fornecidos aqui métodos para produzir isopreno compreendendo: a) a cultura de células sob condições adequadas para a produção de isopreno; e b) a produção de isopreno, em que a concentração de pico do isopreno produzido pelas células em cultura é maior que cerca de 10 ng/L_{caldo} e a taxa de evolução de dióxido de carbono das células é maior que cerca de 1 x 10^{-18}mmol/L/hora. Em algumas modalidades, a concentração de pico do isopreno é qualquer concentração ou quantidade divulgada na seção intitulada "Produção Exemplar de Isopreno". Em algumas modalidades, a concentração de pico do isopreno está entre cerca de qualquer dentre 10 ng/L_{caldo} e 500 ng/L_{caldo}, 500 ng/L_{caldo} e 1 $\mu g/L_{caldo}$, 1 $\mu g/L_{caldo}$ e 5 $\mu g/L_{caldo}$, 5 $\mu g/L_{caldo}$ e 50 $\mu g/L_{caldo}$, 5 $\mu g/L_{caldo}$ e 100 $\mu g/L_{caldo}$, 5 $\mu g/L_{caldo}$ e 250 $\mu g/L_{caldo}$, 250 $\mu g/L_{caldo}$ e 500 $\mu g/L_{caldo}$, 500 $\mu g/L_{caldo}$ e 1 mg/L_{caldo}, 1 mg/L_{caldo} e 50 mg/L_{caldo}, 1 mg/L_{caldo} e 100 mg/L_{caldo}, 1 mg/L_{caldo} e 200 mg/L_{caldo}, 10 ng/L_{caldo} e 200 mg/L_{caldo}, 5 $\mu g/L_{caldo}$ e 100 mg/L_{caldo}, or 5 $\mu g/L_{caldo}$ e 200 mg/L_{caldo}. Em algumas modalidades, a concentração de pico é qualquer dentre cerca de 10 ng/L_{caldo}, 100 ng/L_{caldo}, 1 $\mu g/L_{caldo}$, 5 $\mu g/L_{caldo}$, 1 mg/L_{caldo}, 30 mg/L_{caldo}, 100 mg/L_{caldo}, ou 200 mg/L_{caldo}. Em algumas modalidades, a taxa de evolução de dióxido de carbono está entre cerca de qualquer dentre1 x 10^{-18} mmol/L/hora e cerca de 1 mol/L/hora, 1 mmol/L/hora e 1 mol/L/hora, 25 mmol/L/hora e 750 mmol/L/hora, 25 mmol/L/hora e 75 mmol/L/hora, 250 mmol/L/hora e 750 mmol/L/hora, ou 450 mmol/L/hora e 550 mmol/L/hora. Em algumas modalidades, a taxa de evolução de dióxido de carbono é cerca de qualquer dentre 50 mmol/L/hora, 100 mmol/L/hora, 150 mmol/L/hora, 200 mmol/L/hora, 250 mmol/L/hora, 300 mmol/L/hora, 350 mmol/L/hora, 400 mmol/L/hora, 450 mmol/L/hora, ou 500 mmol/L/hora.

Além disso, também são fornecidos aqui métodos para produzir isopreno compreendendo: a) a cultura de células sob condições adequadas para a produção de isopreno; e b) a produção de isopreno, em que a concentração de pico do isopreno produzido pelas células em cultura é maior que cerca de 10 ng/L_{caldo} e a viabilidade celular é reduzida a menos que cerca de duas vezes. Em algumas modalidades, a concentração de pico do isopreno é qualquer concentração ou quantidade divulgada na seção intitulada

"Produção Exemplar de Isopreno". Em algumas modalidades, a concentração de pico do isopreno está entre cerca de qualquer dentre10 ng/L_{caldo} e 500 ng/L_{caldo}, 500 ng/L_{caldo} e 1 µg/L_{caldo}, 1 µg/L_{caldo} e 5 µg/L_{caldo}, 5 µg/L_{caldo} e 50 µg/L_{caldo}, 5 µg/L_{caldo} e 100 µg/L_{caldo}, 5 µg/L_{caldo} e 250 µg/L_{caldo}, 250 µg/L_{caldo} e 500 µg/L_{caldo}, 500 µg/L_{caldo} e 1 mg/L_{caldo}, 1 mg/L_{caldo} e 50 mg/L_{caldo}, 1 mg/L_{caldo} e 100 mg/L_{caldo}, 1 mg/L_{caldo} e 200 mg/L_{caldo}, 10 ng/L_{caldo} e 200 mg/L_{caldo}, 5 µg/L_{caldo} e 100 mg/L_{caldo}, ou 5 µg/L_{caldo} e 200 mg/L_{caldo}. Em algumas modalidades, a concentração de pico é qualquer dentre cerca de 10 ng/L_{caldo}, 100 ng/L_{caldo}, 1 µg/L_{caldo}, 5 µg/L_{caldo}, 1 mg/L_{caldo}, 30 mg/ L_{caldo}, 100 mg/L_{caldo}, ou 200 mg/L_{caldo}. Em algumas modalidades, a viabilidade celular é reduzida a menos que cerca de qualquer dentre 1,75 vezes, 1,5 vezes, 1,25 vezes, 1 vez, 0,75 vezes, 0,5 vezes, ou 0,25 vezes. Em algumas modalidades, a viabilidade celular é reduzida a cerca de duas vezes.

Também são fornecidas aqui células em cultura compreendendo um ácido nucleico codificando um polipeptídeo de isopreno sintase, em que as células produzem mais que 400 nmol/g_{wcm}/hora de isopreno e a taxa de evolução de dióxido de carbono das células é maior que cerca de 1 x 10^{-18}mmol/L/hora. Em algumas modalidades, o isopreno produzido está em qualquer concentração ou quantidade divulgada na seção intitulada "Produção Exemplar de Isopreno". Em algumas modalidades, a quantidade de isopreno está entre cerca de qualquer dentre 400 nmol/g_{wcm}/hora e 1 mol/g_{wcm}/hora, 400 nmol/g_{wcm}/hora e 1 mmol/g_{wcm}/hora, 400 nmol/g_{wcm}/hora e 40 mmol/g_{wcm}/hora, 400 nmol/g_{wcm}/hora e 4 mmol/g_{wcm}/hora, 1 mmol/g_{wcm}/hora e 1,5 mmol/g_{wcm}/hora, 1,5 mmol/g_{wcm}/hora e 3 mmol/g_{wcm}/hora, 3 mmol/g_{wcm}/hora e 5 mmol/g_{wcm}/hora, 5 mmol/g_{wcm}/hora e 25 mmol/g_{wcm}/hora, 25 mmol/g_{wcm}/hora e 100 mmol/g_{wcm}/hora, 100 mmol/g_{wcm}/hora e 500 mmol/g_{wcm}/hora, ou 500 mmol/g_{wcm}/hora e 1000 mmol/g_{wcm}/hora. Em algumas modalidades, a quantidade de isopreno é cerca de qualquer dentre 1 mmol/g_{wcm}/hora, 1,5 mmol/g_{wcm}/hora, 2 mmol/g_{wcm}/hora, 3 mmol/g_{wcm}/hora, 4 mmol/g_{wcm}/hora, ou 5 mmol/g_{wcm}/hora. Em algumas modalidades, a taxa de evolução de dióxido de carbono está entre cerca de qualquer dentre 1 x 10^{-18} mmol/L/hora e cerca de 1

mol/L/hora, 1 mmol/L/hora e 1 mol/L/hora, 25 mmol/L/hora e 750 mmol/L/hora, 25 mmol/L/hora e 75 mmol/L/hora, 250 mmol/L/hora e 750 mmol/L/hora, ou 450 mmol/L/hora e 550 mmol/L/hora. Em algumas modalidades, a taxa de evolução de dióxido de carbono é cerca de qualquer dentre 50 mmol/L/hora, 100 mmol/L/hora, 150 mmol/L/hora, 200 mmol/L/hora, 250 mmol/L/hora, 300 mmol/L/hora, 350 mmol/L/hora, 400 mmol/L/hora, 450 mmol/L/hora, ou 500 mmol/L/hora.

Também são fornecidas aqui células em cultura compreendendo um ácido nucleico codificando um polipeptídeo de isopreno sintase, em que a produtividade total cumulativa do isopreno produzido pelas células em cultura é maior que cerca de 0,2 mg/L_{caldo}/hora e a taxa de evolução de dióxido de carbono das células é maior que cerca de 1 x 10^{-18}mmol/L/hora. Em algumas modalidades, a produtividade total cumulativa do isopreno é qualquer concentração ou quantidade divulgada na seção intitulada "Produção Exemplar de Isopreno". Em algumas modalidades, a produtividade total cumulativa do isopreno está entre cerca de qualquer dentre 0,2 mg/L_{caldo}/hora e 5 g/L_{caldo}/hora, 0,2 mg/L_{caldo}/hora e 1 g/L_{caldo}/hora, 1 g/L_{caldo}/hora e 2,5 g/L_{caldo}/hora, 2,5 g/L_{caldo}/hora e 5 g/L_{caldo}/hora. Em algumas modalidades, a taxa de evolução de dióxido de carbono está entre cerca de qualquer dentre 1 x 10^{-18} mmol/L/hora e cerca de 1 mol/L/hora, 1 mmol/L/hora e 1 mol/L/hora, 25 mmol/L/hora e 750 mmol/L/hora, 25 mmol/L/hora e 75 mmol/L/hora, 250 mmol/L/hora e 750 mmol/L/hora, ou 450 mmol/L/hora e 550 mmol/L/hora. Em algumas modalidades, a taxa de evolução de dióxido de carbono é cerca de qualquer dentre 50 mmol/L/hora, 100 mmol/L/hora, 150 mmol/L/hora, 200 mmol/L/hora, 250 mmol/L/hora, 300 mmol/L/hora, 350 mmol/L/hora, 400 mmol/L/hora, 450 mmol/L/hora, ou 500 mmol/L/hora.

Além disso, também são fornecidos aqui células em cultura compreendendo um ácido nucleico codificando um polipeptídeo de isopreno sintase, em que a concentração de pico do isopreno produzido pelas células em cultura é maior que cerca de 10 ng/L_{caldo} e a taxa de evolução de dióxido de carbono das células é maior que cerca de 1 x 10^{-18}mmol/L/hora. Em algumas modalidades, a concentração de pico do isopreno é qualquer concen-

tração ou quantidade divulgada na seção intitulada "Produção Exemplar de Isopreno". Em algumas modalidades, a concentração de pico do isopreno está entre cerca de qualquer dentre10 ng/L_{caldo} e 500 ng/L_{caldo}, 500 ng/L_{caldo} e 1 µg/L_{caldo}, 1 µg/L_{caldo} e 5 µg/L_{caldo}, 5 µg/L_{caldo} e 50 µg/L_{caldo}, 5 µg/L_{caldo} e 100 µg/L_{caldo}, 5 µg/L_{caldo} e 250 µg/L_{caldo}, 250 µg/L_{caldo} e 500 µg/L_{caldo}, 500 µg/L_{caldo} e 1 mg/L_{caldo}, 1 mg/L_{caldo} e 50 mg/L_{caldo}, 1 mg/L_{caldo} e 100 mg/L_{caldo}, 1 mg/L_{caldo} e 200 mg/L_{caldo}, 10 ng/L_{caldo} e 200 mg/L_{caldo}, 5 µg/L_{caldo} e 100 mg/L_{caldo}, ou 5 µg/L_{caldo} e 200 mg/L_{caldo}. Em algumas modalidades, a concentração de pico é qualquer dentre cerca de 10 ng/L_{caldo}, 100 ng/L_{caldo}, 1 µg/L_{caldo}, 5 µg/L_{caldo}, 1 mg/L_{caldo}, 30 mg/ L_{caldo}, 100 mg/L_{caldo}, ou 200 mg/L_{caldo}. Em algumas modalidades, a taxa de evolução de dióxido de carbono está entre cerca de qualquer dentre 1 x 10^{-18} mmol/L/hora e cerca de 1 mol/L/hora, 1 mmol/L/hora e 1 mol/L/hora, 25 mmol/L/hora e 750 mmol/L/hora, 25 mmol/L/hora e 75 mmol/L/hora, 250 mmol/L/hora e 750 mmol/L/hora, ou 450 mmol/L/hora e 550 mmol/L/hora. Em algumas modalidades, a taxa de evolução de dióxido de carbono é cerca de qualquer dentre 50 mmol/L/hora, 100 mmol/L/hora, 150 mmol/L/hora, 200 mmol/L/hora, 250 mmol/L/hora, 300 mmol/L/hora, 350 mmol/L/hora, 400 mmol/L/hora, 450 mmol/L/hora, ou 500 mmol/L/hora.

Em algumas modalidades de quaisquer dos métodos e células aqui descritos, a taxa de evolução de dióxido de carbono e/ou viabilidade celular de uma célula expressando um RNA e/ou proteína da via do MVA e/ou via do DXP de uma ou mais de uma cópia em duplicata e/ou heteróloga de um ácido nucleico da via do MVA e/ou via do DXP é comparada a uma célula controle que não possui uma ou mais de uma cópia em duplicata e/ou heteróloga de um ácido nucleico da via do MVA e/ou via do DXP. Em algumas modalidades, a taxa de evolução de dióxido de carbono e/ou viabilidade celular de uma célula expressando um RNA e/ou proteína da via do MVA e/ou via do DXP de uma ou mais de uma cópia em duplicata e/ou heteróloga de um ácido nucleico da via do MVA e/ou via do DXP sob o controle de um promotor induzível, em que o promotor é induzido, é comparado a uma célula controle contendo uma ou mais de uma cópia em duplicata e/ou heteróloga de um ácido nucleico da via do MVA e/ou via do DXP sob o controle de

um promotor induzível, em que o promotor não é induzido (não induzido). Em algumas modalidades, o promotor induzível é um promotor de beta-galactosidase.

Isopreno

A invenção apresenta composições e métodos para a produção de isopreno em quantidades e/ou purezas aumentadas. Como utilizado neste, o termo "isopreno" ou "2-metil-1,3-butadieno" (CAS# 78-79-5) se refere ao produto de hidrocarboneto C5 direto e volátil a partir da eliminação de pirofosfato de pirofosfato de 3,3-dimetilalila (DMAPP) e não envolve a ligação ou polimerização de uma ou mais moléculas de difosfato de isopentenila (IPP) para uma ou mais moléculas DMAPP.

A grande maioria do isopreno é derivada de fontes petroquímicas como uma fração impura de hidrocarboneto C5 que requer a purificação extensiva antes do material ser adequado para a polimerização. Várias impurezas são particularmente problemáticas dada a sua semelhança estrutural com o isopreno e o fato de que podem agir como venenos de catalisador de polimerização. Tais compostos incluem 1,3-ciclopentadieno, *trans*-1,3-pentadieno, *cis*-1,3-pentadieno, 1,4-pentadieno, 1-pentino, 2-pentino, 3-metil-1-butino, pent-4-ene-1-ino, *trans*-pent-3-ene-1-ino, *cis*-pent-3-ene-1-ino, 3-hexen-1-ol, acetato de 3-hexen-1-ila, limoneno, geraniol (trans-3,7-dimetil-2,6-octadien-1-ol) e citronelol (3,7-dimetil-6-octen-1-ol) (figura 90). Em outras modalidades, as impurezas podem ser 3-hexen-1-ol, acetato de 3-hexen-1-ila, limoneno, geraniol (trans-3,7-dimetil-2,6-octadien-1-ol) e citronelol (3,7-dimetil-6-octen-1-ol). Em algumas modalidades, a composição de isopreno da invenção é substancialmente livre de qualquer hidrocarboneto C5 contaminante e não saturado. Como descrito em maiores detalhes no Exemplo 10, nenhuma quantidade detectável de hidrocarbonetos C5 não saturados diferentes de isopreno (como 1,3-ciclopentadieno, *trans*-1,3-pentadieno, *cis*-1,3-pentadieno, 1,4-pentadieno, 1-pentino, 2-pentino, 3-metil-1-butino, pent-4-ene-1-ino, *trans*-pent-3-ene-1-ino, *cis*-pent-3-ene-1-ino, 3-hexen-1-ol, acetato de 3-hexen-1-ila, limoneno, geraniol (trans-3,7-dimetil-2,6-octadien-1-ol) e citronelol (3,7-dimetil-6-octen-1-ol)) foi encontra-

da em composições de isopreno produzidas com o uso de métodos descritos neste. Algumas composições de isopreno produzidas com o uso de métodos descritos neste contêm etanol, acetona e álcool prenílico C5 como determinado pela Análise GC/MS. Todos esses componentes são mais facilmente removíveis a partir do vapor de isopreno que a fração isomérica dos hidrocarbonetos C5 que estão presentes em composições de isopreno derivadas de fontes petroquímicas. Assim, em algumas modalidades, as composições de isopreno da invenção necessitam de um tratamento mínimo de forma a estarem em nível de polimerização.

Sob um aspecto, composições e métodos da invenção aumentam a taxa de produção de isopreno e aumentam a quantidade total de isopreno que é produzida. Por exemplo, sistemas de cultura de células que geram 4,8 x 10^4 nmol/gwcm/h de isopreno foram produzidas (Tabela 1). A eficiência de tais sistemas é demonstrada pela conversão de cerca de 2,2% do carbono que as células consomem de um meio de cultura celular no isopreno. Como mostrado nos Exemplos e na Tabela 2, aproximadamente 3 g de isopreno por litro de caldo foram gerados. Caso desejado, quantidades ainda maiores de isopreno podem ser obtidas com o uso de outras condições, como as descritas neste. Em algumas modalidades, a fonte de carbono renovável é utilizada para a produção de isopreno. Em algumas modalidades, a produção de isopreno é separada a partir do crescimento das células. Em algumas modalidades, as concentrações de isopreno e quaisquer oxidantes são dentro dos limites não inflamáveis para reduzir ou eliminar o risco de um incêndio ocorrer durante a produção ou recuperação de isopreno. As composições e métodos da presente invenção são desejáveis porque permitem altos rendimentos de isopreno por célula, altos rendimentos de carbono, alta pureza de isopreno, alta produtividade, baixo uso de energia, pequeno custo de produção e investimentos e reações adversas mínimas. Esse processo eficiente, em larga escala e biossintético para a produção de isopreno fornece uma fonte de isopreno para borracha com base em isopreno sintético e fornece alternativas desejáveis, de baixo custo, ao uso de borracha natural.

Como discutido em maiores detalhes abaixo, a quantidade de

isopreno produzido por células pode aumentar muito através da introdução de um ácido nucleico heterólogo codificando um polipeptídio de isopreno sintase (por exemplo, um polipeptídeo de isopreno sintase vegetal) nas células. Os polipeptídios de isopreno sintase convertem difosfato de dimetilalila (DMAPP) em isopreno. Como mostrado nos Exemplos, um polipeptídio de isopreno sintase de *Pueraria montana* (kudzu) heterólogo foi expresso em uma variedade de células hospedeiras, como *Escherichia coli, Pantoea citrea, Bacillus subtilis, Yarrowia lipolitica* e *Trichoderma reesei.* Todas estas células produziram mais isopreno que as células correspondentes sem polipeptídio heterólogo de isopreno sintase. Como ilustrado nas Tabelas 1 e 2, grandes quantidades de isopreno são produzidas com o uso de métodos descritos neste. Por exemplo, Células de *B. subtilis* com ácido nucleico heterólogo de isopreno sintase produziram aproximadamente 10 vezes mais isopreno em fermentador de 14 litros que as células de *B. subtilis* de controle correspondentes sem ácido nucleico heterólogo (Tabela 2). A produção de 300 mg de isopreno por litro de caldo (mg/L, em que o volume de caldo inclui tanto o volume do meio das células quanto o volume das células) por *E. coli* e 30 mg/L por *B. subtilis* em fermentadores indica que quantidades significantes de isopreno podem ser geradas (Tabela 2). Caso desejado, o isopreno pode ser produzido em escalas ainda maiores ou outras condições descritas neste podem ser utilizadas para aumentar mais a quantidade de isopreno. Os vetores listados nas Tabelas 1 e 2 e as condições experimentais são descritos em maiores detalhes abaixo e na seção de exemplos.

Tabela 1: Rendimentos exemplares de isopreno em um recipiente agitado com o uso de culturas de células e métodos da invenção.

O ensaio para a medição da produção de isopreno é descrito no Exemplo I, parte II. Para esse ensaio, uma amostra foi removida em um ou mais momentos do recipiente agitado e cultivada por 30 minutos. A quantidade de isopreno produzido em tal amostra foi então medida. A concentração *headspace* e taxa específica de produção de isopreno são listadas na Tabela 1 e descritas em maiores detalhes neste.

Cepa	Produção de isopreno em frasco *headspace**	
	Concentração de *headspace* ($\mu g/L_{gas}$)	Taxa específica $\mu g/L_{caldo}/h/OD$ ($nmol/g_{wcm}/h$)
E. coli BL21/ pTrcKudzu IS	1,40	53,2 (781,2)
E. coli BL21/ pCL DXS yidi Kudzu IS	7,61	289,1 ($4,25 \times 10^3$)
E. coli BL21/MCM127 com IS de kudzu e toda a via do MVA	23,0	874,1 ($12,8 \times 10^3$)
E. coli BL21/ pET N-HisKudzu IS	1,49	56,6 (831,1)
Pantoea citrea /pTrcKudzu IS	0,66	25,1 (368,6)
E. coli w/ Poplar IS [Miller (2001)]	-	5,6 (82,2)
Bacillis licheniformis Fall US 5849970	-	4,2 (61,4)
Yarrowia lipolitica com isopreno sintase de kudzu	~0,05 µg/L	~2 (~30)
Trichoderma reesei com isopreno sintase de kudzu	~0,05 µg/L	~2 (~30)
E. coli BL21/ pTrcKKD$_y$I$_k$IS com IS de kudzu e via inferior do MVA	85,9	$3,2 \times 10^3$ ($4,8 \times 10^4$)

*Normalizado a 1 mL de 1 OD_{600}, cultivado por uma hora em frasco *headspace* selado com uma razão entre o líquido e o volume *headspace* de 1:19.

Tabela 2: Rendimentos exemplares de isopreno em um fermentador com o uso de culturas de células e métodos da invenção.

O ensaio para a medição da produção de isopreno é descrito no Exemplo I, parte II. Para esse ensaio, uma amostra do gás de escape do fermentador foi tirada e analisada para uma quantidade de isopreno. O pico da concentração de *headspace* (que é a maior concentração de *headspace* durante a fermentação), título (que é a quantidade total e cumulativa de isopreno produzido por litro de caldo) e taxa específica do pico de produção de isopreno (que é a taxa específica mais alta durante a fermentação) são listados na Tabela 2 e descritos em maiores detalhes neste.

Cepa	Produção de isopreno em fermentadores		
	Pico da concentração de *headspace*** ($\mu g/L_{gas}$)	Concentração (mg/L_{caldo})	Taxa Específica e Pico $\mu g/L_{caldo}/h/OD$ ($nmol/g_{wcm}/h$)
E. coli BL21/pTrcKudzu com Kudzu IS	52	41,2	37 (543,3)
E. coli FM5/pTrcKudzu IS	3	3,5	21,4 (308,1)
E. coli BL21/ cepa tripla (DXS, yidi, IS)	285	300	240 (3,52 x 10^3)
E. coli FM5/ cepa tripla (DXS, yidi, IS)	50,8	29	180,8 (2,65 x 10^3)
E. coli/MCM127 com IS de kudzu e toda a via do MVA	3815	3044	992,5 (1,46 x 10^4)
E. coli BL21/pCLPtrc UpperVia gi1.2 via inferior ntegrada pTrcKudzu i	2418	1640	1248 (1,83 x 10^4)
*E. coli*BL21/MCM401 com 4 x 50 µM de IPTG	13991	23805	3733 (5,49 x 10^4)
*E. coli*BL21/MCM401 com 2 x 1000 µM de IPTG	22375	19541	5839,5 (8,59 x 10^4)
E. coli BL21/pCLPtrc UpperViaHGS2 - pTrcKKDyIkIS	3500	3300	1088 (1,60 x 10^4)
Bacillus subtilis selvagem	1,5	2,5	0,8 (11,7)
Bacillus pBS Kudzu IS	16,6	~30 (mais de 100 h)	5 (73,4)
Bacillus Marburg 6051 [Wagner e Fall (1999)]	2,04	0,61	24,5 (359,8)
Bacillus Marburg 6051 Fall US 5849970	0,7	0,15	6,8 (100)

** Normalizado a uma taxa de fluxo de gás de escape de 1 vvm (1 volume gás de escape por 1 L_{caldo} por minuto).

Adicionalmente, a produção de isopreno por células que contêm ácidos nucleicos heterólogos de isopreno sintase pode aumentar pelo aumento da quantidade de um polipeptídio 1-desóxi-D-xilulose-5-fosfato sintase (DXS) e/ou um polipeptídio de isopentenil difosfato isomerase (IDI) expresso pelas células. Por exemplo, um ácido nucleico DXS e/ou um ácido nucleico IDI podem ser induzidos em células. O ácido nucleico DXS pode ser

um ácido nucleico heterólogo ou uma cópia duplicada de um ácido nucleico endógeno. De forma similar, o ácido nucleico IDI pode ser um ácido nucleico heterólogo ou uma cópia duplicada de um ácido nucleico endógeno. Em algumas modalidades, a quantidade de polipeptídio DXS e/ou IDI é aumentada pela substituição dos promotores DXS e/ou IDI endógenos ou regiões reguladoras por outros promotores e/ou regiões reguladoras que resultam em maior transcrição dos ácidos nucleicos DXS e/ou IDI. Em algumas modalidades, as células contêm tanto um ácido nucleico heterólogo codificando um polipeptídio de isopreno sintase (por exemplo, ácidos nucleicos vegetais de isopreno sintase) quanto uma cópia duplicada de um ácido nucleico endógeno codificando um polipeptídio de isopreno sintase.

Os polipeptídios codificados DXS e IDI são parte da via DXP para a biossíntese de isopreno (figura 19A). Os polipeptídios DXS convertem o piruvato e D-gliceraldeído-3-fosfato em 1-desóxi-D-xilulose-5-fosfato. Embora não exista a intenção de se ligar a uma teoria específica, acredita-se que o aumento da quantidade de polipeptídio DXS aumenta o fluxo de carbono através da via DXP, levando a uma maior produção de isopreno. Polipeptídios IDI catalisam a interconversão de difosfato de isopentenila (IPP) e difosfato de dimetilalila (DMAPP). Embora não exista a intenção de se ligar a uma teoria específica, acredita-se que o aumento da quantidade de polipeptídio IDI em células aumenta a quantidade (e a taxa de conversão) de IPP que é convertido em DMAPP, que, por sua vez é convertido em isopreno.

Por exemplo, a fermentação de células de *E. coli* com ácidos nucleicos de isopreno sintase de kudzu, IDI de *S. cerevisiae* e DXS de *E. coli* foi utilizada para a produção de isopreno. Os níveis de isopreno variaram entre 50 a 300 µg/L por um período de 15 horas (Exemplo 7, parte VII).

Em algumas modalidades, a presença de ácidos nucleicos de isopreno sintase, IDI e DXS heterólogos ou extraendógenos, faz células crescerem de forma mais reprodutiva ou manterem-se viáveis por mais tempo quando comparadas com a célula correspondente com apenas um ou dois de tais ácidos nucleicos heterólogos ou extraendógenos. Por exemplo, células contendo ácidos nucleicos heterólogos de isopreno sintase IDI e

DXS, cresceram melhor que as células com somente ácidos nucleicos heterólogos de isopreno sintase e DXS ou com apenas ácidos nucleicos heterólogos de isopreno sintase. Além disso, ácidos nucleicos heterólogos de isopreno sintase, IDI e DXS foram ligados de forma operativa com sucesso a um promotor forte em plasmídeo de alta cópia que era mantido por células de *E. coli*, sugerindo que grandes quantidades de tais polipeptídios podem ser expressas nas células sem causar quantidade excessiva de toxicidade às células. Embora não exista a intenção de se ligar a nenhuma teoria específica, acredita-se que a presença de ácidos nucleicos IDI e isopreno sintase heteróloga ou extraendógena pode reduzir uma quantidade de um ou mais intermediários potencialmente tóxicos que iriam de outra forma acumular somente se um ácido nucleico DXS heterólogo ou extraendógeno estivesse presente nas células.

Em algumas modalidades, a produção de isopreno por células que contêm ácidos nucleicos heterólogos de isopreno sintase é aumentada pelo aumento da quantidade de polipeptídio MVA expresso pelas células (figuras 19A e 19B). Polipeptídios exemplares de vias do MVA incluem quaisquer dos seguintes polipeptídios: polipeptídios de acetil-CoA acetiltransferase (AA-CoA tiolase), polipeptídios de 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA sintase (HMG-CoA sintase), polipeptídios de 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA redutase (HMG-CoA redutase), polipeptídios de mevalonato quinase (MVK), polipeptídios defosfomevalonato quinase (PMK), polipeptídios de difosfomevalonato descarboxilase (MVD), polipeptídios de fosfomevalonato descarboxilase (PMDC), polipeptídios de isopentenil fosfato quinase (IPK), polipeptídios de IDI e polipeptídios (por exemplo, polipeptídios de fusão) contendo uma atividade de dois ou mais polipeptídios da via do MVA. Por exemplo, um ou mais ácidos nucleicos da via do MVA podem ser introduzidos nas células. Em algumas modalidades, as células contêm a via superior do MVA, que inclui ácidos nucleicos de AA-CoA tiolase, HMG-CoA sintase e HMG-CoA redutase. Em algumas modalidades, as células contêm a via inferior do MVA, que inclui ácidos nucleicos de MVK, PMK, MVD e IDI. Em algumas modalidades, as células contêm uma via do MVA completa que inclui ácidos

nucleicos de AA-CoA tiolase, HMG-CoA sintase, HMG-CoA redutase, MVK, PMK, MVD e IDI. Em algumas modalidades, as células contêm uma via do MVA completa que inclui ácidos nucleicos de AA-CoA tiolase, HMG-CoA sintase, HMG-CoA redutase, MVK, PMDC, IPK e IDI. Os ácidos nucleicos da via do MVA podem ser ácidos nucleicos heterólogos ou cópias duplicadas de ácidos nucleicos endógenos. Em algumas modalidades, a quantidade de um ou mais polipeptídios da via do MVA é aumentada pela substituição do promotor endógeno ou regiões reguladoras pelos ácidos nucleicos da via do MVA com outros promotores e/ou regiões reguladoras que resultam em maior transcrição dos ácidos nucleicos da via do MVA. Em algumas modalidades, as células contêm tanto um ácido nucleico heterólogo codificando um polipeptídio de isopreno sintase (por exemplo, um ácido nucleico de isopreno sintase vegetal) e uma cópia duplicada de um ácido nucleico endógeno codificando um polipeptídio de isopreno sintase.

Por exemplo, células de *E. coli* contendo um ácido nucleico codificando um polipeptídio de isopreno sintase de kudzu e ácidos nucleicos codificando polipeptídios MVK, PMK, MVD e IDI de *Saccharomyces cerevisia* geraram isopreno em uma taxa de 6,67 x 10-4 mol/L_{caldo}/OD_{600}/h (vide Exemplo 8). Adicionalmente, uma fermentação de 14 litros de células *E. coli* com ácidos nucleicos codificando polipeptídios de AA-CoA tiolase, HMG-CoA sintase e HMG-CoA redutase de *Enterococcus faecalis* produz 22 gramas de ácido mevalônico (um intermediário da via do MVA). Um recipiente agitado de tais células produz 2-4 gramas de ácido mevalônico por litro. Esses resultados indicam que ácidos nucleicos heterólogos da via do MVA são ativos em células de *E. coli* que contêm ácidos nucleicos tanto para a via superior do MVA quanto para a via inferior do MVA assim como um isopreno sintase de kudzu (cepa MCM 127) produz significativamente mais isopreno (874 ug/L) quando comparado com células de *E. coli* com ácidos nucleicos somente para a via inferior do MVA e a isopreno sintase de kudzu (cepa MCM 131) (vide Tabela 3 e Exemplo 8, parte VIII).

Em algumas modalidades, pelo menos uma parte das células mantém ácido nucleico heterólogo de isopreno sintase, DXS, IDI, e/ou via do

MVA por pelo menos cerca de 5, 10, 20, 50, 75, 100, 200, 300, ou mais divisões celulares em uma cultura contínua (como uma cultura contínua sem diluição). Em algumas modalidades de quaisquer dos aspectos da invenção, os ácidos nucleicos que compreendem ácidos nucleicos heterólogos ou cópia duplicada de uma isopreno sintase endógena, DXS, IDI, e/ou via do MVA também compreendem um marcador seletivo, como um ácido nucleico de resistência ao antibiótico canamicina, ampicilina, carbenicilina, gentamicina, higromicina, fleomicina, bleomicina, neomicina, ou de cloranfenicol.

Como indicado no Exemplo 7, parte VI, a quantidade de isopreno produzida pode ser aumentada através da adição de extrato de levedura à célula em meio de cultura. Nesse exemplo, a quantidade de isopreno produzido foi linearmente proporcional à quantidade de extrato de levedura no meio celular para as concentrações testadas (figura 48C). Adicionalmente, aproximadamente 0,11 grama de isopreno por litro de caldo foi produzido a partir de meio celular com extrato de levedura e glicose (Exemplo 7, parte VIII). Ambos os experimentos utilizaram células de *E. coli* com ácidos nucleicos de isopreno sintase de kudzu, IDI de *S. cerevisia* e DXS de *E. coli* para a produção de isopreno. O aumento da quantidade de extrato de levedura na presença de glicose resultou em mais isopreno sendo produzido do que o aumento da quantidade de glicose na presença do extrato de levedura. Além disso, o aumento da quantidade de extrato de levedura permitiu que as células produzissem um alto nível de isopreno por uma maior quantidade de tempo e melhorou a saúde das células.

A produção de isopreno foi também demonstrada com o uso de três tipos de biomassa hidrolisada (bagaços, palhas de milho e polpa de madeira macia) como fonte de carbono (figuras 46A-C). As células de *E. coli* com ácidos nucleicos de isopreno sintase de kudzu, IDI de *S. cerevisia* e DXS de *E. coli* produziram tanto isopreno a partir dessas fontes de carbono de biomassa hidrolisada a partir da quantidade equivalente de glicose (por exemplo, 1% de glicose, p/v). Caso desejado, qualquer outra fonte de carbono de biomassa pode ser usada nas composições e métodos da invenção. As fontes de carbono de biomassa são desejáveis por serem mais econômi-

cas que muitos meios de célula convencionais, facilitando, portanto, a produção econômica de isopreno.

Adicionalmente, o açúcar invertido apresentou funcionar como uma fonte de carbono para a geração de isopreno (figuras 47C e 96-98). Por exemplo, 2,4 g/L de isopreno foram produzidos a partir de células expressando vias de polipeptídio MVA e isopreno sintase de kudzu (Exemplo 8, parte XV). O gicerol foi utilizado também como uma fonte de carbono para a geração de 2,2 mg/L de isopreno a partir de células expressando isopreno sintase de kudzu (Exemplo 8, parte XIV).

A expressão de um ácido nucleico DXS, um ácido nucleico IDI, e/ou um ou mais entre ácidos nucleicos de via do MVA (como ácidos nucleicos codificando toda a via do MVA) além de ácidos nucleicos de isopreno sintase pode aumentar a produção de isopreno a partir de gicerol.

Em algumas modalidades, um óleo é incluído no meio celular. Por exemplo, células de *B. subtilis* contendo ácidos nucleicos de isopreno sintase de kudzu produzem isopreno quando cultivadas em meio celular contendo um óleo e uma fonte de glicose (Exemplo 4, parte III). Em algumas modalidades, mais de um óleo (como 2, 3, 4, 5, ou mais óleos) são incluídos no meio celular. Embora não exista a intenção de se ligar a nenhuma teoria específica, acredita-se que (i) o óleo pode aumentar a quantidade de carbono nas células que estão disponíveis para a conversão para isopreno, (ii) o óleo pode aumentar a quantidade de acetil-CoA nas células, aumentando, portanto o fluxo de carbono através da via do MVA, e/ou (ii) o óleo pode fornecer nutrientes extras para as células, o que é desejável, já que boa parte do carbono nas células é convertida para isopreno ao invés de outros produtos. Em algumas modalidades, as células que são cultivadas em meio celular contendo óleo naturalmente utilizam a via do MVA para a produção de isopreno ou são geneticamente modificadas para conter ácidos nucleicos para a via do MVA inteira. Em algumas modalidades, o óleo é parcialmente ou completamente hidrolisado antes de ser adicionado ao meio de cultura da célula para facilitar o uso do óleo pelas células hospedeiras.

Uma das maiores dificuldades da produção comercial de peque-

nas moléculas como isopreno em células (por exemplo, bactérias) é o desacoplamento entre a produção da molécula e o crescimento das células. Em algumas modalidades para a produção comercialmente viável de isopreno, uma quantidade significativa de carbono a partir da matéria-prima é convertida em isopreno, ao invés de para o crescimento e a manutenção das células ("eficiência do carbono"). Em várias modalidades, as células convertem mais que ou cerca de 0,0015, 0,002, 0,005, 0,01, 0,02, 0,05, 0,1, 0,12, 0,14, 0,16, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,2, 1,4, 1,6, 1,8, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, ou 8,0% do carbono no meio de cultura da célula em isopreno. Em modalidades específicas, uma parte significativa do carbono a partir da matéria-prima que é convertida em produtos a jusante é convertida em isopreno. Como descrito em maiores detalhes no Exemplo 11, as células de *E. coli* expressando ácidos nucleicos da via do MVA e de isopreno sintase de kudzu exibiram desacoplamento entra a produção de isopreno ou do ácido mevalônico intermediário e o crescimento, resultando na alta eficiência do carbono. Em particular, o ácido mevalônico foi formado a partir de células expressando a via superior do MVA de *Enterococcus faecalis*. O isopreno foi formado a partir de células expressando a via superior do MVA de *Enterococcus faecalis*, a via inferior do MVA *Saccharomyces cerevisiae* e a isopreno sintase de *Pueraria montana* (Kudzu). Esse desacoplamento entre a produção de isopreno ou ácido mevalônico e o crescimento foi demonstrado em quatro cepas diferentes de *E. coli*: BL21(LDE3), BL21(LDE3) Tuner, FM5 e MG1655. As primeiras duas cepas de *E. coli* são cepas B e as duas últimas são cepas K12. O desacoplamento entre a produção e o crescimento foi também demonstrado em uma variante de MG1655 com os genes ack e pta deletados. Essa variante também demonstrou menor produção de acetato.

Produção de Etileno

A invenção caracteriza métodos para a produção de etileno (CAS# 74-85-1) usando cultura de células, Em algumas modalidades, etileno se refere ao produto de hidrocarboneto C2 volátil final da conversão de 2-oxoglutarato, um intermediário do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) pela enzima formadora de etileno (efe). O etileno é usado na fabricação de polí-

meros como polietileno, poliéster, cloreto de polivinila e poliestireno, assim como fibras e outras substâncias químicas orgânicas.

São aqui fornecidos métodos para produzir um composto, em que o composto tem uma ou mais características selecionadas do grupo que consiste em (a) um coeficiente da lei de Henry inferior a cerca de 250M/atm e (b) uma solubilidade em água de menos de cerca de 100 g/L. Em algumas modalidades, o método compreende: a) a cultura de células sob condições adequadas para a produção do composto, em que é adicionado gás (como a adição de gás a um sistema como um sistema de fermentação) em uma taxa de pulverização gasosa entre cerca de 0 vvm e cerca de 2 vvm; e b) a produção do composto. Em outras modalidades, o método compreende: a) a cultura de células sob condições adequadas para a produção do composto; b) a produção do composto; e c) a recuperação do composto na fase gasosa. Em algumas modalidades, o método compreende: a) a cultura de células sob condições adequadas para a produção do composto; b) a produção do composto; e c) a recuperação do composto a partir da fase gasosa. Em algumas modalidades, o coeficiente da lei de Henry do composto é inferior a cerca de 200 M/atm, 150 M/atm, 100 M/atm, 75 M/atm, 50 M/atm, 25 M/atm, 10 M/atm, 5 M/atm, ou 1 M/atm. Em algumas modalidades, a solubilidade em água do composto é inferior a cerca de qualquer dentre 75 g/L, 50 g/L, 25 g/L, 10 g/L, 5 g/L, ou 1g/L. Em algumas modalidades, o composto é selecionado de um grupo que consiste em isopreno, um aldeído (por exemplo, acetaldeído), uma cetona (por exemplo, acetona, metil etil cetona ou 2-butanona), um álcool (por exemplo, metanol, etanol, 1-butanol, ou alcoóis C5 como 3-metil-3-buten-1-ol ou 3-metil-2-buten-1-ol), um éster de um álcool (por exemplo, acetato de etila, ésteres de 3-metil-2-buten-1-ol, ou acetil ésteres de alcoóis C5), um hemiterpeno, um monoterpeno, um sesquiterpeno e hidrocarbonetos C1 a C5 (por exemplo, metano, etano, etileno, ou propileno). Em algumas modalidades, os hidrocarbonetos C1 a C5 são saturados, insaturados ou ramificados. Em algumas modalidades, o hidrocarboneto C1 a C5 é um hidrocarboneto alifático insaturado (p. ex. etileno, propeno, butileno, ou isobutileno). Em algumas modalidades, o hidrocarboneto C1 a C5 é

uma oleofina. Em modalidades particulares, o composto é isopreno. Em outras modalidades particulares, o composto é etileno. Em algumas modalidades, isopreno e etileno são coproduzidos. Em algumas modalidades dos métodos para produzir quaisquer dos compostos descritos acima, a taxa de pulverização gasosa está entre cerca de qualquer dentre 0 vvm a 0,1 vvm, 0,1 vvm a 1 vvm, 0,2 vvm a 1 vvm, ou 0,5 vvm a 1 vvm. Em algumas modalidades dos métodos para produzir quaisquer dos compostos descritos acima, a taxa de pulverização gasosa é 0,0 vvm.

Sob um aspecto, a invenção caracteriza métodos para produzir etileno, Em algumas modalidades, o método compreende: a) a cultura de células sob condições adequadas para a produção de etileno, em que é adicionado gás (como a adição de gás a um sistema como um sistema de fermentação) em uma taxa de pulverização gasosa entre cerca de 0,01 vvm e cerca de 2 vvm; b) a produção de etileno. Em outras modalidades, o método compreende: a) a cultura de células sob condições adequadas para a produção de etileno; e b) a produção de etileno; e c) a recuperação do etileno na fase gasosa. Em algumas modalidades dos métodos para produzir etileno, a taxa de pulverização gasosa está entre cerca de qualquer dentre 0,0 vvm a 0,1 vvm, 0,1 vvm a 1 vvm, 0,2 vvm a 1 vvm, ou 0,5 vvm a 1 vvm. Em algumas modalidades dos métodos para produzir etileno, a taxa de pulverização gasosa é 0,0 vvm.

Sob um aspecto, a invenção apresenta células em cultura que produzem um composto, em que o composto tem uma ou mais características selecionadas do grupo que consiste em (a) um coeficiente da lei de Henry inferior a cerca de 250M/atm e (b) uma solubilidade em água de menos de cerca de 100 g/L. Em algumas modalidades, as células possuem um ácido nucleico heterólogo que (i) codifica polipeptídio sintase capaz de produzir o composto e (ii) é ligado de forma operacional a um promotor. Em algumas modalidades, o composto produzido é etileno e o polipeptídio sintase é enzima que forma etileno (efe). Em algumas modalidades, o promotor é a região promotora do gene ffh de *E.coli*, em que o promotor ffh se dirige à expressão constitutiva de efe. Em algumas modalidades, as células são culti-

vadas em um meio de cultura que inclui uma ou mais fontes de carbono, como, mas não limitado a, um carboidrato, glicerol, glicerina, di-hidroxiacetona, fonte de um carbono, óleo, gordura animal, óleo animal, ácido graxo, lipídio, fosfolipídio, gicerolipídio, monoglicerídeo, diglicerídeo, triglicerídeo, fonte de carbono renovável, polipeptídio (por exemplo, uma proteína ou peptídeo vegetal ou microbiano), extrato de levedura, componente de um extrato de levedura. Em algumas modalidades, as células são cultivadas sob condições de glicose limitada.

Se isopreno e etileno são coproduzidos, então eles podem ser separados durante a recuperação como descrito aqui ou por outros meios conhecidos por alguém versado na técnica. Em um aspecto da invenção, o etileno é recuperado por adsorção. Em algumas modalidades, o etileno é adsorvido em uma argila modificada por prata. Em algumas modalidades, o gás de escape da fermentação é desumidificado e passado por um filtro de argila modificada por prata a fim de remover etileno do fluxo de gás de escape, seguido pela dessorção do etileno do filtro de prata-argila usando um ciclo de oscilação de pressão. Em algumas modalidades, o gás de escape da fermentação é adicionalmente tratado antes da introdução no filtro de prata-argila pela pulverização através de uma solução de hidróxido de sódio aquoso a fim de remover dióxido de carbono. Em outro aspecto da invenção, o etileno é recuperado por separação criogênica ou dessorção/arraste.

Polipeptídios e ácidos nucleicos exemplares

Vários polipeptídios e ácidos nucleicos de isopreno sintase, efe, DXS, IDI, e/ou via do MVA podem ser utilizados nas composições e métodos da invenção.

Como utilizado aqui, "polipeptídios" inclui polipeptídios, proteínas, peptídeos, fragmentos de polipeptídios e polipeptídios de fusão. Em algumas modalidades, o polipeptídio de fusão inclui parte ou tudo de um primeiro polipeptídio (por exemplo, um polipeptídio ou fragmento cataliticamente ativo de isopreno sintase, efe, DXS, IDI, ou via do MVA) e pode opcionalmente incluir parte ou tudo de um segundo polipeptídio (por exemplo, um peptídeo que facilita a purificação ou detecção do polipeptídio de fusão,

como uma marcação His). Em algumas modalidades, o polipeptídio de fusão possui uma atividade de dois ou mais polipeptídios da via do MVA (como polipeptídios de AA-CoA tiolase e HMG-CoA redutase). Em algumas modalidades, o polipeptídio é um polipeptídio de ocorrência natural (como o polipeptídio codificado por um ácido nucleico de *mvaE* de *Enterococcus faecalis*) que possui uma atividade de dois ou mais polipeptídios a via do MVA.

Em várias modalidades, o polipeptídio possui pelo menos ou cerca de 50, 100, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, ou mais aminoácidos. Em algumas modalidades, o fragmento de polipeptídio contém pelo menos ou cerca de 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300, ou mais aminoácidos contíguos a partir de um polipeptídio completo e possui pelo menos ou cerca de 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, ou 100% de uma atividade de um polipeptídio completo correspondente. Em modalidades específicas, o polipeptídio inclui um segmento ou toda a sequência de aminoácidos de qualquer polipeptídio que ocorra naturalmente de isopreno sintase, efe, DXS, IDI, ou via do MVA de. Em algumas modalidades, o polipeptídio possui uma ou mais mutações quando comparado com a sequência de polipeptídio selvagem (isto é, a sequência que ocorre na natureza), de isopreno sintase efe, DXS, IDI, ou via do MVA.

Em algumas modalidades, o polipeptídio é um polipeptídio isolado. Como utilizado neste, um "polipeptídio isolado" não é parte de uma biblioteca de polipeptídios, como a biblioteca de 2, 5, 10, 20, 50 ou mais polipeptídios diferentes e são separados por pelo menos um componente que ocorra na natureza. Um polipeptídio isolado pode ser obtido, por exemplo, por expressão de ácidos nucleicos recombinantes codificando o polipeptídio.

Em algumas modalidades, o polipeptídio é um polipeptídio heterólogo. Por "polipeptídio heterólogo" deve ser compreendido um polipeptídio cuja sequência de aminoácidos não é idêntica àquela de outro polipeptídio expresso de forma natural na mesma célula hospedeira. Em particular, um polipeptídio heterólogo não é idêntico a um ácido nucleico selvagem que é encontrado na mesma célula hospedeira na natureza.

Como utilizado neste, um "ácido nucleico" se refere a um ou dois

ou mais desoxirribonucleotídeos e/ou ribonucleotídeos em forma de fita simples ou dupla. Em algumas modalidades, os ácidos nucleicos são ácidos nucleicos recombinantes. Por "ácidos nucleicos recombinantes" deve ser compreendido ácidos nucleicos de interesse que são livres de um ou mais ácidos nucleicos (por exemplo, genes) que, no genoma ocorrendo na natureza do organismo do qual os ácidos nucleicos de interesse são derivados, flanqueiam os ácidos nucleicos de interesse. O termo, portanto, inclui, por exemplo, um DNA recombinante que é incorporado em um vetor, em um plasmídeo de replicação autônoma ou vírus, ou no DNA genômico de um procarioto ou eucarioto, ou que existe como uma molécula separada (por exemplo, um cDNA, um fragmento de DNA genômico, ou um fragmento de cDNA produzido por PCR ou digestão de endonuclease de restrição) independente de outras sequências. Em várias modalidades, ácidos nucleicos são ácidos nucleicos recombinantes. Em algumas modalidades, ácidos nucleicos de isopreno sintase, efe, DXS, IDI, ou via do MVA são ligados de forma operacional a outros ácidos nucleicos codificando o todo ou uma parte de outro polipeptídio, de forma que os ácidos nucleicos recombinantes codificam um polipeptídio de fusão que inclui um polipeptídio de isopreno sintase, efe, DXS, IDI, ou via do MVA e o todo ou parte de outro polipeptídio (por exemplo, um peptídeo que facilita a purificação ou detecção do polipeptídio de fusão, como a marcação His). Em algumas modalidades, parte ou todo o ácido nucleico recombinante é quimicamente sintetizado. Deve ser compreendido que mutações, incluindo mutações de nucleotídeos únicos, podem ocorrer dentro de ácidos nucleicos como definido aqui.

Em algumas modalidades, os ácidos nucleicos são um ácido nucleico heterólogo. Por "ácido nucleico heterólogo" deve ser compreendido ácidos nucleicos cuja sequência de ácidos nucleicos não é idêntica àquela de outro ácido nucleico naturalmente encontrado na mesma célula hospedeira.

Em modalidades específicas, os ácidos nucleicos incluem um segmento de ou toda a sequência de ácidos nucleicos de qualquer ácido nucleico de isopreno sintase, efe, DXS, IDI, ou de via do MVA que ocorra

naturalmente. Em algumas modalidades, ácidos nucleicos incluem pelo menos ou cerca de 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, ou mais nucleotídeos contíguos de um ácido nucleico de isopreno sintase, ácido nucleido de efe, ácido nucleico de DXS, IDI, ou via do MVA que ocorram naturalmente. Em algumas modalidades, os ácidos nucleicos possuem uma ou mais mutações quando comparados com a sequência de ácidos nucleicos de isopreno sintase, efe, DXS, IDI, ou via do MVA selvagem (isto é, uma sequência que ocorra na natureza). Em algumas modalidades, os ácidos nucleicos possuem uma ou mais mutações (por exemplo, uma mutação silenciosa) que aumentam a transcrição ou tradução de ácido nucleico de isopreno sintase, efe, DXS, IDI, ou via do MVA. Em algumas modalidades, os ácidos nucleicos são uma variante degenerada de quaisquer ácidos nucleicos codificando polipeptídios de isopreno sintase, efe, DXS, IDI, ou via do MVA.

"Degenerância de códons" se refere à divergência no código genético que permite a variação da sequência nucleotídica sem afetar a sequência de aminoácidos de um polipeptídio codificado. Aquele versado na técnica está ciente da "propensão de códon" exibida por uma célula hospedeira específica no uso de códons de nucleotídeos para especificar certo aminoácido. Portanto, durante a síntese de ácidos nucleicos para expressão melhorada em célula hospedeira, é desejável em algumas modalidades a projeção de ácidos nucleicos de forma que sua frequência de uso de códon se aproxime da frequência do uso de códon preferencial da célula hospedeira.

Os números de acesso de polipeptídios e ácidos nucleicos exemplares de isopreno sintase, DXS, IDI, e/ou via do MVA são listados no Apêndice 1 (os números de acesso do Apêndice 1 e suas sequências correspondentes são neste incorporados por referência em sua totalidade, especificamente no que diz respeito ao aminoácido e à sequência de ácidos nucleicos de isopreno sintase, DXS, IDI, e/ou via do MVA de polipeptídios e ácidos nucleicos). O banco de dados Kegg também contém o aminoácido e sequência de ácidos nucleicos de vários polipeptídios e ácidos nucleicos exemplares de isopreno sintase, DXS, IDI, e/ou vias MVA de (vide, por e-

xemplo, o site da internet "genome.jp/kegg/pathway/map/map00100.html" e as sequências destes, que são incorporadas neste por referência em sua totalidade, especificamente no que diz respeito às sequências de aminoácidos e ácidos nucleicos de polipeptídios e ácidos nucleicos de isopreno sintase, DXS, IDI, e/ou via do MVA). Em algumas modalidades, um ou mais de polipeptídios e/ou ácidos nucleicos de isopreno sintase, DXS, IDI, e/ou via do MVA possuem uma sequência idêntica a uma sequência publicamente disponível em 12 de dezembro de 2007 ou 14 de setembro de 2008 como quaisquer das sequências que correspondem a quaisquer dos números de acesso no Apêndice 1 ou quaisquer das sequências presentes no banco de dados Kegg. Exemplos adicionais de polipeptídios e ácidos nucleicos de isopreno sintase, DXS, IDI, e/ou via do MVA são descritos em maiores detalhes abaixo.

Exemplos de Polipeptídios de Isopreno Sintases e Ácidos Nucleicos

Como observado acima, polipeptídios de isopreno sintase convertem difosfato de dimetilalila (DMAPP) em isopreno. Exemplos de polipeptídio de isopreno sintases incluem polipeptídios, fragmentos de polipeptídios, peptídeos e polipeptídios de fusão que possuem pelo menos uma atividade de um polipeptídio de isopreno sintase. Métodos padrão podem ser usados para determinar se um polipeptídio possui atividade de polipeptídio de isopreno sintase pela medida da capacidade do polipeptídio converter DMAPP no isopreno *in vitro*, em um extrato de célula, ou *in vivo*. Em exemplos de ensaio, extratos de célula são preparados pelo cultivo de uma cepa (por exemplo, a cepa *E. coli*/pTrcKudzu descrita aqui) no método de recipiente agitado como descrito no Exemplo 1. Após a indução estar completa, aproximadamente 10 mL de células são peletados por centrifugação em 7000 x g por 10 minutos e resssuspensos em 5 mL de PEB sem gicerol. As células são lisadas com o uso de uma célula de Pressão Francesa com o uso de procedimentos padrão. Como alternativa, as células são tratadas com lisozima (solução de lisozima Ready-Lyse; EpiCentre) após congelamento/degelo em -80°C.

A atividade de polipeptídio de isopreno sintase no extrato da cé-

lula pode ser medida, por exemplo, como descrito em Silver *et al.,* J. Biol. Chem. 270:13010-13016, 1995 e referências deste, que são incorporadas neste por referência em sua totalidade, especificamente no que diz respeito aos ensaios para atividade de polipeptídio de isopreno sintase. DMAPP (Sigma) é evaporado para secar sob vapor de nitrogênio e reidratar por uma concentração de 100 mM em 100 mM de tampão de fosfato de potássio pH 8,2 e armazenado em -20°C. Para executar o ensaio, a solução de 5 µL de 1M de $MgCl_2$, 1 mM (250 µg/mL) de DMAPP, 65 µL de Tampão de extrato vegetal (PEB) (50 mM de Tris-HCl, pH 8,0, 20 mM de $MgCl_2$, 5% de gicerol e 2 mM de DTT) é adicionada a 25 µL de extrato de célula em um frasco *Headspace* de 20 mL com a tampa de metal rosqueada e septo de silicone coberto por teflon (Agilent Technologies) e cultivado em 37°C por 15 minutos com agitação. A reação é interrompida pela adição de 200 µL de 250 mM de EDTA e quantificada por GC/MS como descrito no Exemplo 1, parte II.

Exemplos de ácidos nucleicos de isopreno sintase incluem ácidos nucleicos que codificam polipeptídio, fragmento de polipeptídio, peptídeo, ou polipeptídios de fusão que possuem pelo menos uma atividade de um polipeptídio de isopreno sintase. Exemplos de polipeptídio de isopreno sintases e ácidos nucleicos incluem polipeptídios e ácidos nucleicos que ocorrem naturalmente a partir de quaisquer dos organismos fonte descritos neste assim como polipeptídios mutantes e ácidos nucleicos derivados de quaisquer dos organismos fonte descritos neste.

Em algumas modalidades, o polipeptídio de isopreno sintase ou ácidos nucleicos são de família Fabaceae, como a subfamília Faboideae. Em algumas modalidades, o polipeptídio de isopreno sintase ou ácidos nucleicos são polipeptídios ou ácidos nucleicos de *Pueraria montana* (kudzu) (Sharkey *et al.,* Planta Physiology 137: 700-712, 2005), *Pueraria lobata*, álamo (como *Populus alba, Populus nigra, Populus trichocarpa,* ou *Populus alba* x *tremula* (CAC35696) Miller *et al.,* Planta 213: 483-487, 2001) aspen (como *Populus tremuloides*) Silver *et al.,* JBC 270(22): 13010-1316, 1995), ou Carvalho Vermelho (*Quercus robur*) (Zimmer *et al.,* WO 98/02550), que são incorporadas neste por referência em sua totalidade, especificamente no

que diz respeito a ácidos nucleicos de isopreno sintase e à expressão de polipeptídio de isopreno sintases. Isopreno sintases adequadas incluem, mas não são limitadas a, aquelas identificadas pelos Nos. de Acesso do Genbank AY341431, AY316691, AY279379, AJ457070 e AY182241, que são incorporados neste por referência em sua totalidade, especificamente no que diz respeito às sequências de ácidos nucleicos e polipeptídios de isopreno sintase. Em algumas modalidades, o polipeptídio ou ácido nucleico de isopreno sintase não é um polipeptídio ou ácido nucleico que ocorre naturalmente a partir de *Quercus robur* (isto é, o polipeptídio ou ácido nucleico de isopreno sintase é um polipeptídio ou ácido nucleico de isopreno sintase diferente do polipeptídio ou ácido nucleico que ocorre naturalmente a partir de *Quercus robur*). Em algumas modalidades, o ácido nucleico ou polipeptídio de isopreno sintase é polipeptídio ou ácido nucleico que ocorre naturalmente a partir de álamo. Em algumas modalidades, o ácido nucleico ou polipeptídio de isopreno sintase não é um polipeptídio ou ácido nucleico que ocorre naturalmente a partir de álamo.

Exemplos de Polipeptídios e Ácidos Nucleicos de efe

Como observado acima, polipeptídios de enzima formadora de etileno (efe) convertem 2-oxoglutarato em etileno. Exemplos de polipeptídios de efe incluem polipeptídios, fragmentos de polipeptídios, peptídeos e polipeptídios de fusão que possuem pelo menos uma atividade de um polipeptídio efe. Uma enzima formadora de etileno adequada inclui, mas não está limitada a, aquela identificada pelo No. de Acesso do Genbank EF175870, que é por meio deste incorporado como referência em sua totalidade, particularmente com relação às sequências de ácidos nucleicos e polipeptídeos de efe. Métodos padrão (como aqueles descritos aqui) podem ser utilizados para determinar se um polipeptídio possui atividade de polipeptídio de efe através da medição da capacidade do polipeptídio converter 2-oxoglutarato em etileno *in vitro*, em um extrato de célula, ou *in vivo*. Exemplos de ácidos nucleicos de efe incluem ácidos nucleicos que codificam um polipeptídio, fragmento de um polipeptídio, peptídeo, ou polipeptídio de fusão que possui pelo menos uma atividade de um polipeptídio efe. Exemplos de polipeptídios

e ácidos nucleicos de efe incluem polipeptídios e ácidos nucleicos que ocorrem naturalmente de quaisquer organismos fonte descritos neste assim como polipeptídios e ácidos nucleicos mutantes derivados de quaisquer organismos fonte descritos neste.

Exemplos de Polipeptídios e Ácidos Nucleicos DXS

Como observado acima, polipeptídios de 1-desóxi-D-xilulose-5-fosfato sintase (DXS) convertem piruvato e D-gliceraldeído-3-fosfato em 1-desóxi-D-xilulose-5-fosfato. Exemplos de polipeptídios DXS incluem polipeptídios, fragmentos de polipeptídios, peptídeos e polipeptídios de fusão que possuem pelo menos uma atividade de um polipeptídio DXS. Métodos padrão (como os descritos neste) podem ser utilizados para determinar se um polipeptídio possui atividade de polipeptídio DXS através da medida da capacidade do polipeptídio converter piruvato e D-gliceraldeído-3-fosfato em 1-desóxi-D-xilulose-5-fosfato *in vitro*, em um extrato de célula, ou *in vivo*. Exemplos de ácidos nucleicos DXS incluem ácidos nucleicos que codificam polipeptídio, fragmento de polipeptídio, peptídeo, ou polipeptídios de fusão que possuem pelo menos uma atividade de um polipeptídio DXS. Exemplos de polipeptídios DXS e ácidos nucleicos incluem polipeptídios e ácidos nucleicos que ocorrem naturalmente a partir de quaisquer organismos fonte descritos neste assim como polipeptídios e ácidos nucleicos mutantes derivados de quaisquer organismos fonte descritos neste.

Exemplos de Polipeptídios e Ácidos nucleicos IDI

Polipeptídios de isopentenil difosfato isomerase (isopentenil-difosfato delta-isomerase ou IDI) catalisam a interconversão de difosfato de isopentenila (IPP) e difosfato de dimetilalila (DMAPP) (por exemplo, a conversão de IPP em DMAPP e/ou a conversão de DMAPP em IPP). Exemplos de Polipeptídio de IDI incluem polipeptídios, fragmentos de polipeptídios, peptídeos e polipeptídios de fusão que possuem pelo menos uma atividade de um polipeptídio IDI. Métodos padrão (como os descritos neste) podem ser utilizados para determinar se um polipeptídio possui atividade de polipeptídio IDI através da medida da capacidade do polipeptídio de interconverter IPP e DMAPP *in vitro*, em um extrato de célula, ou *in vivo*. Exemplos de Ácidos

nucleicos IDI incluem ácidos nucleicos que codificam polipeptídio, fragmento de polipeptídio, peptídeo, ou polipeptídios de fusão que possuem pelo menos uma atividade de um polipeptídio IDI. Em uma modalidade, uma fusão de difosfomevalonato descarboxilase-IDI de *Coxiella burnetti* é feita. Em outra modalidade, uma fusão de IDI-IsoS (isopreno sintase) é feita. Exemplos de Polipeptídio e ácidos nucleicos de IDI incluem polipeptídios e ácidos nucleicos que ocorrem naturalmente a partir de quaisquer organismos fonte descritos neste assim como polipeptídios e ácidos nucleicos mutantes derivados de quaisquer organismos fonte descritos neste.

Exemplos de Polipeptídios e Ácidos Nucleicos da Via do MVA

Exemplos de polipeptídios da via do MVA incluem polipeptídios de acetil-CoA acetiltransferase (AA-CoA tiolase), polipeptídios de 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA sintase (HMG-CoA sintase), polipeptídios de 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA redutase (HMG-CoA redutase), polipeptídios de mevalonato quinase (MVK), polipeptídios de fosfomevalonato quinase (PMK), polipeptídios de difosfomevalonato descarboxilase (MVD), polipeptídios de fosfomevalonato descarboxilase (PMDC), polipeptídios de isopentenil fosfato quinase (IPK), polipeptídio de IDI e polipeptídios (por exemplo, polipeptídios de fusão) com atividade de dois ou mais polipeptídios da via do MVA de. Em particular, polipeptídios da via do MVA incluem polipeptídios, fragmentos de polipeptídios, peptídeos e polipeptídios de fusão que possuem pelo menos uma atividade de um polipeptídio da via do MVA. Exemplos de ácidos nucleicos da via do MVA incluem ácidos nucleicos que codificam polipeptídio, fragmento de polipeptídio, peptídeo, ou polipeptídios de fusão que possuem pelo menos uma atividade de um polipeptídio da via do MVA. Exemplos de polipeptídios e ácidos nucleicos da via do MVA de incluem polipeptídios e ácidos nucleicos que ocorrem naturalmente a partir de quaisquer organismos fonte descritos neste assim como polipeptídios e ácidos nucleicos mutantes derivados de quaisquer organismos fonte descritos neste.

Em particular, polipeptídios de acetil-CoA acetiltransferase (AA-CoA tiolase ou AACT) convertem duas moléculas de acetil-CoA em acetoacetil-CoA. Métodos padrão (como os descritos neste) podem ser utilizados

para determinar se um polipeptídio possui atividade de polipeptídio de AA-CoA tiolase através da medida da capacidade do polipeptídio converter duas moléculas de acetil-CoA em acetoacetil-CoA *in vitro*, em um extrato de célula, ou *in vivo*.

Polipeptídios de 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA sintase (HMG-CoA sintase ou HMGS) convertem acetoacetil-CoA em 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA. Métodos padrão (como os descritos neste) podem ser utilizados para determinar se um polipeptídio possui atividade de polipeptídio de HMG-CoA sintase através da medida da capacidade do polipeptídio converter acetoacetil-CoA em 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA *in vitro*, em extrato de célula, ou *in vivo*.

Polipeptídios de 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA redutase (HMG-CoA redutase ou HMGR) convertem 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA em mevalonato. Métodos padrão (como os descritos neste) podem ser utilizados para determinar se um polipeptídio possui atividade de polipeptídio de HMG-CoA redutase através da medida da capacidade do polipeptídio converter 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA em mevalonato *in vitro*, em um extrato de célula, ou *in vivo*.

Polipeptídios de mevalonato quinase (MVK) fosforilam mevalonato para formar mevalonato-5-fosfato. Métodos padrão (como os descritos neste) podem ser utilizados para determinar se um polipeptídio possui atividade de polipeptídios MVK através da medida da capacidade do polipeptídio converter mevalonato em mevalonato-5-fosfato *in vitro*, em um extrato de célula, ou *in vivo*.

Polipeptídios de fosfomevalonato quinase (PMK) fosforilam mevalonato-5-fosfato para formar mevalonato-5-difosfato. Métodos padrão (como os descritos neste) podem ser utilizados para determinar se um polipeptídio possui atividade de polipeptídios de PMK através da medida da capacidade do polipeptídio converter mevalonato-5-fosfato em mevalonato-5-difosfato *in vitro*, em um extrato de célula, ou *in vivo*.

Polipeptídios de difosfomevalonato descarboxilase (MVD ou DPMDC) convertem mevalonato-5-difosfato em difosfato de isopentenila

(IPP). Métodos padrão (como os descritos neste) podem ser utilizados para determinar se um polipeptídio possui atividade de polipeptídios MVD através da medida da capacidade do polipeptídio converter mevalonato-5-difosfato em IPP *in vitro*, em um extrato de célula, ou *in vivo*.

Polipeptídios de fosfomevalonato descarboxilase (PMDC) convertem mevalonato-5-fosfato em fosfato de isopentenila (IP). Métodos padrão (como os descritos neste) podem ser utilizados para determinar se um polipeptídio possui atividade de polipeptídios PMDC através da medida da capacidade do polipeptídio converter mevalonato-5-fosfato em IP *in vitro*, em um extrato de célula, ou *in vivo*.

Polipeptídios de isopentenil fosfato quinase (IPK) fosforilam fosfato de isopentila (IP) para formar difosfato de isopentenila (IPP). Métodos padrão (como os descritos neste) podem ser utilizados para determinar se um polipeptídio possui atividade de polipeptídios IPK através da medida da capacidade de o polipeptídio converter IP em IPP *in vitro*, em um extrato de célula, ou *in vivo*.

Exemplos de polipeptídios e ácidos nucleicos de IDI são descritos acima.

Exemplos de Métodos para Isolar Ácidos Nucleicos

Ácidos nucleicos de isopreno sintase, efe, DXS, IDI, e/ou via do MVA podem ser isolados com o uso de métodos padrão. Métodos para obter ácidos nucleicos desejados a partir de um organismo fonte de interesse (como um genoma bacteriano) são comuns e conhecidos na técnica de biologia molecular (vide, por exemplo, WO 2004/033646 e referências citadas neste, que são incorporadas neste por referência em sua totalidade, especificamente no que diz respeito à isolação de ácidos nucleicos de interesse). Por exemplo, se a sequência dos ácidos nucleicos for conhecida (como quaisquer dos ácidos nucleicos conhecidos descritos neste), bibliotecas genômicas adequadas podem ser criadas pela digestão de endonuclease de restrição e podem ser analisadas com sondas complementadas à sequência de ácidos nucleicos desejada. Após a sequência ser isolada, o DNA pode ser amplificado com o uso de iniciador padrão direcionado a métodos de

amplificação como a reação em cadeia da polimerase (PCR) (Patente No. U.S. 4.683.202, que é incorporada por referência em sua totalidade, especificamente no que diz respeito a métodos PCR) para obter quantidades de DNA adequadas para a transformação com o uso de vetores apropriados.

Como alternativa, ácidos nucleicos de isopreno sintase, efe, DXS, IDI, e/ou via do MVA (como quaisquer ácidos nucleicos de isopreno sintase, efe, DXS, IDI, e/ou via do MVA com sequência conhecida de ácidos nucleicos) pode ser quimicamente sintetizado com o uso de métodos padrão.

Polipeptídios e ácidos nucleicos adicionais de isopreno sintase, efe, DXS, IDI, ou via do MVA de que podem ser adequados para o uso nas composições e métodos descritos neste podem ser identificados com o uso de métodos padrão. Por exemplo, bibliotecas de cosmídeos do DNA cromossômico de organismos conhecidos para a produção de isopreno naturalmente podem ser construídos em organismos como *E. coli* e então analisados para a produção de isopreno. Em particular, bibliotecas de cosmídeos podem ser criadas em locais onde grandes segmentos de DNA genômico (35-45 kb) são empacotados em vetores e usados para transformar hospedeiros adequados. Cosmídeos vetores são únicos em sua capacidade de acomodar grandes quantidades de DNA. Geralmente, cosmídeos vetores de pelo menos uma cópia de sequência de cos DNA que é necessária para empacotar subsequentemente circularizar o DNA heterólogo. Adicionalmente a sequência cos, esses vetores também contêm a origem de replicação como ColEI e marcadores de resistência a fármacos como ácidos nucleicos resistentes à ampicilina ou neomicina. Métodos de uso dos cosmídeos vetores para a transformação de hospedeiros bacterianos adequados são descritos em Sambrook *et al.,* Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor, 1989, que é incorporado neste por referência em sua totalidade, especificamente no que diz respeito a métodos de transformação.

Tipicamente para clonar cosmídeos, o DNA heterólogo é isolado com o uso de endonucleases de restrição apropriadas e ligado de forma adjacente à região cos do cosmídeo vetor com o uso de ligases apropriadas.

Cosmídeos vetores contendo um DNA heterólogo linearizado são então reagidos com o veículo de empacotamento de DNA como bacteriófago. Durante o processo de empacotamento, os locais sítios cos são clivados e o DNA heterólogo é empacotado com a parte da cabeça da partícula viral bacteriana. Essas partículas são então usadas para transfectar células hospedeiras adequadas como *E. coli*. Após ser injetado na célula, o DNA heterólogo circulariza sob a influência das extremidades aderentes do cos. Dessa forma, grandes segmentos de DNA heterólogo podem ser introduzidos e expressos em células hospedeiras.

Métodos adicionais para obter ácidos nucleicos de isopreno sintase, efe, DXS, IDI, e/ou via do MVA incluem a análise de uma biblioteca metagenômica por ensaio (como o ensaio *headspace* descrito neste) ou por PCR utilizando iniciadores direcionados contra os nucleotídeos codificando o comprimento de aminoácidos conservados (por exemplo, pelo menos 3 aminoácidos conservados). Aminoácidos conservados podem ser identificados por alinhamento de sequência de aminoácidos de polipeptídios conhecidos de isopreno sintase, efe, DXS, IDI, e/ou via do MVA. Aminoácidos conservados para polipeptídios de isopreno sintase podem ser identificados com base em sequências alinhadas de polipeptídios de isopreno sintases conhecidos. Um organismo descoberto por produzir isopreno naturalmente pode ser sujeito a métodos padrão de purificação de proteína (que são bem-conhecidos na técnica) e o polipeptídio resultante purificado pode ser sequenciado com o uso de métodos padrão. Outros métodos são encontrados na literatura (vide, por exemplo, Julsing *et al.*, *Applied. Microbiol. Biotechnol. 75*: 1377-84, 2007; Comers *et al.*, *Appl Environ Microbiol.* 73(19):6277-83, 2007, que são incorporadas neste por referência em sua totalidade, especificamente no que diz respeito à identificação de ácidos nucleicos envolvidos na síntese de isopreno).

Adicionalmente, o alinhamento da sequência padrão e/ou programas de previsão da estrutura podem ser utilizados para identificar polipeptídios e ácidos nucleicos DXS, IDI, ou via do MVA com base na similaridade da sua estrutura primária e/ou secundária prevista com a de polipeptí-

dios e ácidos nucleicos DXS, IDI, ou via do MVA conhecidos. Bancos de dados padrão como o banco de dados swissprot-trembl (com site em "expasy.org", Swiss Institute of Bioinformatics Swiss-Prot group CMU - 1 rue Michel Servet CH-1211 Genebra 4, Suíça) também pode ser utilizado para identificar polipeptídios e ácidos nucleicos de isopreno sintase, efe, DXS, IDI, ou via do MVA. A estrutura secundária e/ou terciária de um polipeptídio de isopreno sintase, efe, DXS, IDI, ou via do MVA pode ser prevista com o uso de configurações padrão de programas de previsão de estruturas, como PredictProtein (630 West, 168 Street, BB217, Nova Iorque, N.Y. 10032, EUA). Como alternativa, a estrutura secundária e/ou terciária real de um polipeptídio de isopreno sintase, efe, DXS, IDI, ou via do MVA pode ser determinada com o uso de métodos padrão. Ácidos nucleicos adicionais de isopreno sintase, efe, DXS, IDI, ou via do MVA também podem ser identificados por hibridização com sondas geradas a partir de ácidos nucleicos de isopreno sintase conhecidos, efe, DXS, IDI, ou via do MVA.

Exemplos de Promotores e Vetores

Qualquer ácido nucleico de isopreno sintase, efe, DXS, IDI, ou via do MVA descrito aqui pode ser incluído em um ou mais vetores. Assim, a invenção também inclui vetores com mais um ácido nucleico codificando quaisquer polipeptídios de isopreno sintase, efe, DXS, IDI, ou via do MVA que são descritos aqui. Como utilizado aqui, um "vetor" deve ser compreendido como uma estrutura que é capaz de entregar e desejavelmente expressar um ou mais ácidos nucleicos de interesse em uma célula hospedeira. Exemplos de vetores incluem, mas não são limitados a, plasmídeos, vetores virais, vetores de expressão de DNA ou RNA, cosmídeos e vetores de fago. Em algumas modalidades, o vetor contém ácidos sob o controle de uma sequência de expressão de controle.

Como utilizado aqui, uma "sequência de controle de expressão" deve ser compreendida como uma sequência de ácidos nucleicos que direciona a transcrição de ácidos nucleicos de interesse. Uma sequência de controle de expressão pode possuir um promotor, como um promotor constitutivo ou indutível, ou um aumentador. Um "promotor indutível" é um promotor

que é ativo sob regulamentação ambiental ou de desenvolvimento. A sequência de controle de expressão é ligada de forma operacional aos segmentos de ácidos nucleicos a serem transcritos.

Em algumas modalidades, o vetor contém um marcador seletivo. O termo "marcador seletivo" se refere a ácidos nucleicos capazes de expressão em uma célula hospedeira que permite a facilidade da seleção daquelas células hospedeiras contendo um ácido nucleico introduzido ou vetor. Exemplos de marcadores selecionáveis incluem, mas não são limitados a, ácidos nucleicos de resistência a antibióticos (por exemplo, canamicina, ampicillina, carbenicillina, gentamicina, higromicina, fleomicina, bleomicina, neomicina, ou cloranfenicol) e/ou ácidos nucleicos que conferem vantagem metabólica, como uma vantagem nutricional na célula hospedeira. Exemplos de marcadores nutricionais seletivos incluem os marcadores conhecidos na técnica como *amdS, argB* e *pyr4*. Marcadores úteis em sistemas de vetores para a transformação de *Trichoderma* são conhecidos na técnica (vide, por exemplo, Finkelstein, Capítulo 6 em Biotechnology of Filamentous Fungi, Finkelstein *et al.,* Eds. Butterworth-Heinemann, Boston, MA, Chap. 6., 1992; e Kinghorn *et al.,* Applied Molecular Genetics of Filamentous Fungi, Blackie Academic and Professional, Chapman e Hall, London, 1992, que são incorporados aqui por referência em sua totalidade, especificamente no que diz respeito a marcadores seletivos). Em algumas modalidades, o marcador seletivo é um ácido nucleico *amdS*, que codifica a enzima acetamidase, permitindo que as células transformadas cresçam em acetamida como fonte de nitrogênio. O uso de um ácido nucleico de *amdS* de *A. nidulans* como um marcador seletivo é descrito em Kelley *et al.,* EMBO J. 4:475 – 479, 1985 e Penttila *et al.,* Gene 61:155-164, 1987 (que são incorporadas aqui por referência em sua totalidade, especificamente no que diz respeito a marcadores seletivos). Em algumas modalidades, ácidos nucleicos de isopreno sintase, DXS, IDI, ou via do MVA se integram a um cromossoma das células sem um marcador seletivo.

Vetores adequados são aqueles que são compatíveis com a célula hospedeira utilizada. Vetores adequados podem derivar, por exemplo,

de uma bactéria, um vírus (bacteriófago T7 ou um fago derivado de M-13), um cosmídeo, uma levedura, ou uma planta. Protocolos para obtenção e utilização desses vetores são conhecidos por técnicos (ver, por exemplo, Sambrook *et al,* Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed, Cold Spring Harbor, 1989, e incorporadas aqui por referência totalidade, especificamente relacionado ao uso de vetores).

Promotores são bem-conhecidos na técnica. Qualquer promotor que funciona na célula hospedeira pode ser utilizado para expressão de um ácido nucleico de isopreno sintase, efe, DXS, IDI, ou via do MVA na célula hospedeira. Regiões de controle de iniciação ou promotores, que são úteis para dirigir a expressão de ácidos nucleicos de isopreno sintase, efe, DXS, IDI, ou via do MVA em várias células hospedeiras são inúmeras e familiares para aqueles versados na técnica (veja, por exemplo, WO 2004/033646 e referências já citadas aqui, que são incorporadas aqui por referência em sua totalidade, especificamente no que diz respeito a vetores para a expressão de ácidos nucleicos de interesse). Praticamente qualquer promotor capaz de conduzir estes ácidos nucleicos é adequado para a presente invenção, mas não limitado a, CYC1, HIS3, GAL1, GAL10, ADH1, PGK, PHO5, GAPDH, ADCI, TRP1, URA3, LEU2, ENO e TPI (útil para expressão em *Saccharomyces*); AOX1 (útil para expressão em *Pichia*); e ffh, lac, trp, λP_L, λP_R, T7, tac e trc (útil para expressão em *E. coli*).

Em algumas modalidades, um promotor de glicose isomerase é usado (ver, por exemplo, Patente U.S. No. 7.132.527 e referências citadas aqui, que são incorporadas aqui por referência em sua totalidade, especificamente no que diz respeito a sistemas promotores e plasmídeo para expressar polipeptídios de interesse). Mutantes de promotor de glicose isomerase relatados podem ser usados para variar o nível de expressão do polipeptídio codificado por um ácido nucleico ligado de forma operativa ao promotor de glicose isomerase (Patente U.S. No.7.132.527). Em várias modalidades, o promotor de glicose isomerase é contido em um plasmídeo de baixa, média ou, alta cópia (Patente U.S. No.7.132.527).

Em várias modalidades, um ácido nucleico de isopreno sintase,

efe, DXS, IDI e/ou ou via do MVA está contido em um plasmídeo de baixa cópia (por exemplo, um plasmídeo que é mantido em cerca de 1 a cerca de 4 cópias por célula), plasmídeo de média cópia (por exemplo, um plasmídeo que é mantido em cerca de 10 a cerca de 15 cópias por célula), ou plasmídeo de alta cópia (por exemplo, um plasmídeo que é mantido em cerca de 50 ou mais cópias por célula). Em algumas modalidades, o ácido nucleico heterólogo ou extraendógeno de isopreno sintase, efe, DXS, IDI, ou via do MVA é ligado de forma operacional ao promotor T7. Em algumas modalidades, o ácido nucleico heterólogo ou extraendógeno de isopreno sintase, efe, DXS, IDI, ou via do MVA ligado de forma operativa ao promotor T7 é contido em um plasmídeo de média ou alta cópia. Em algumas modalidades, o ácido nucleico heterólogo ou extraendógeno de isopreno sintase, efe, DXS, IDI, ou via do MVA é ligado de forma operacional ao promotor Trc. Em algumas modalidades, o ácido nucleico heterólogo ou extraendógeno de isopreno sintase, efe, DXS, IDI, ou via do MVA ligado de forma operativa ao promotor Trc é contido em um plasmídeo de média ou alta cópia. Em algumas modalidades, o ácido nucleico heterólogo ou extraendógeno de isopreno sintase, efe, DXS, IDI, ou via do MVA é ligado de forma operacional ao Promotor Lac. Em algumas modalidades, o ácido nucleico heterólogo ou extraendógeno de isopreno sintase, efe, DXS, IDI, ou via do MVA ligado de forma operativa ao promotor Lac é contido em plasmídeo de baixa cópia. Em algumas modalidades, o ácido nucleico heterólogo ou extraendógeno de isopreno sintase, efe, DXS, IDI, ou via do MVA é ligado de forma operacional a um promotor endógeno, como um promotor endógeno de *Escherichia, Pantoea, Bacillus, Yarrowia, Streptomyces,* ou *Trichoderma* ou um promotor endógeno de serina protease alcalina, isopreno sintase, efe, DXS, IDI, ou via do MVA. Em algumas modalidades, o ácido nucleico heterólogo ou extraendógeno de isopreno sintase, efe, DXS, IDI, ou via do MVA ligado de forma operativa ao promotor endógeno é contido em plasmídeo de alta cópia. Em algumas modalidades, o vetor é um plasmídeo replicante que não se integra em um cromossoma nas células. Em algumas modalidades, parte ou todo o vetor se integra em um cromossoma nas células.

Em algumas modalidades, o vetor é qualquer vetor que, quando introduzido em uma célula hospedeira fúngica é integrado no genoma da célula e é replicado. Referência é feita ao Catálogo Central de Estoque Genético Fúngico de Cepas (FGSC, endereço eletrônico "fgsc.net" e referências citadas aqui, que são incorporadas aqui por referência em sua totalidade, especificamente no que diz respeito a vetores) para uma lista dos vetores. Exemplos adicionais de vetores de expressão e/ou integração adequados são fornecidos em Sambrook *et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edição., Cold Spring Harbor, 1989, *Current Protocols em Molecular Biology* (F. M. Ausubel *et al.* (eds) 1987, Suplemento 30, seção 7.7.18); van den Hondel *et al.* em Bennett e Lasure (Eds.) *More Gene Manipulations in Fungi*, Academic Press pp. 396-428, 1991; e Patente U.S. No.5.874.276, que são incorporadas aqui por referência em sua totalidade, especificamente no que diz respeito a vetores. Vetores particularmente úteis incluem pFB6, pBR322, PUC18, pUC100 e pENTR/D.

Em algumas modalidades, um ácido nucleico de isopreno sintase, efe, DXS, IDI, ou via do MVA é ligado de forma operacional ao promotor adequado que apresenta atividade transcricional em uma célula hospedeira fúngica. O promotor pode ser derivado de um ou mais ácidos nucleicos codificando um polipeptídio que é endógeno ou heterólogo para a célula hospedeira. Em algumas modalidades, o promotor é útil em um hospedeiro *Trichoderma*. Exemplos adequados não limitantes de promotores incluem *cbh*1, *cbh*2, *egl*1, *egl*2, *pep*A, *hfb*1, *hfb*2, *xyn*1 e *amy*. Em algumas modalidades, o promotor é um que é nativo da célula hospedeira. Por exemplo, em algumas modalidades quando *T. reesei* é o hospedeiro, o promotor é um promotor de *T. reesei* nativo. Em algumas modalidades, o promotor é *cbh1* de *T. reesei*, que é um promotor induzível e foi depositado no GenBank sob o No. de acesso D86235, que é incorporado por referência em sua totalidade, especificamente no que diz respeito a promotores. Em algumas modalidades, o promotor é um heterólogo para a célula hospedeira fúngica. Outros exemplos de promotores úteis incluem promotores dos genes de glicoamilase (glaA) de *A. awamori* e *A. niger* (Nunberg *et al.*, Mol. Cell Biol. 4:2306-2315,

1984 e Boel *et al.*, EMBO J. 3:1581-1585, 1984, que são incorporadas aqui por referência em sua totalidade, especificamente no que diz respeito a promotores); alfa amilases de *Aspergillus niger*, TAKA amilase de *Aspergillus oryzae*, *xln*1 de *T. reesei* e a celobio-hidrolase 1 de *T. reesei* (EP 137280, que é incorporada por referência em sua totalidade, especificamente no que diz respeito a promotores).

Em algumas modalidades, o vetor de expressão também inclui uma sequência de terminação. Regiões de controle de terminação também podem ser derivadas de vários genes nativos da célula hospedeira. Em algumas modalidades, a sequência de terminação e a sequência promotora são derivadas uma vez que tenha mesma fonte. Em outra modalidade, a sequência de terminação é endógena à célula hospedeira. Uma sequência de terminador particularmente adequada é *cbh*1 derivada de uma cepa de *Trichoderma* (como *T. reesei*). Outros terminadores úteis incluem fungos de terminação de um *A. niger* ou *A. awamori* glicoamilase ácidos nucleicos (Nunberg *et al.*, Mol. Cell Biol. 4:2306-2315, 1984 e Boel *et al.*, EMBO J. 3:1581-1585, 1984; que são incorporadas aqui por referência em sua totalidade, especificamente no que diz respeito a terminadores fúngicos). Opcionalmente, um sítio de terminação pode ser incluído. Para a expressão efetiva de polipeptídios, o DNA codificando o polipeptídio é operavelmente ligado através de códons de iniciação às regiões de controle de expressão selecionadas, de forma que a expressão que os resulte na formação do RNA mensageiro adequado.

Em algumas modalidades, o promotor, região de codificação, e terminador são todos originários do ácido nucleico de isopreno sintase, efe, DXS, IDI, ou via do MVA a ser expresso. Em algumas modalidades, região de codificação do ácido nucleico de isopreno sintase, efe, DXS, IDI, ou via do MVA é inserida em um vetor de expressão de uso geral, de forma que ela esteja sob controle transcricional de sequências de promotor e terminador de construto de expressão. Em algumas modalidades, genes ou parte destes são inseridos a jusante do promotor forte *cbh*1.

Um ácido nucleico de isopreno sintase, efe, DXS, IDI, ou via do

MVA pode ser incorporado em um vetor, como um vetor de expressão, utilizando técnicas padronizadas (Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual,* Cold Spring Harbor, 1982, que é incorporada aqui por referência em sua totalidade, especificamente no que diz respeito à seleção adequada de sequências de DNA e à construção de vetores). Métodos usados para ligar o construto de DNA compreendendo um ácido nucleico de interesse (como um ácido nucleico de isopreno sintase, efe, DXS, IDI, ou via do MVA), um promotor, um terminador e outras sequências e inseri-los em um vetor adequado são conhecidos na técnica. Por exemplo, enzimas de restrição podem ser usadas para clivar o ácido nucleico de isopreno sintase, efe, DXS, IDI, ou via do MVA e o vetor. Em seguida, as extremidades compatíveis do ácido nucleico clivado de isopreno sintase, efe, DXS, IDI, ou via do MVA e do vetor clivado podem ser ligadas. A adesão é geralmente feita por ligação em sítios de restrição convenientes. Se esses sítios não existem, os ligantes oligonucleotídicos sintéticos são utilizados de acordo com a prática convencional (ver, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor, 1989 e Bennett e Lasure, More Gene Manipulations em Fungi, Academic Press, San Diego, pp 70–76, 1991, que são incorporadas aqui por referência em sua totalidade, especificamente no que diz respeito a ligantes de oligonucleotídeos). Adicionalmente, vetores podem ser construídos com técnicas de recombinação conhecidas (por exemplo, Invitrogen Life Technologies, Gateway Technology).

Em algumas modalidades, pode ser desejável superexpressar ácidos nucleicos de isopreno sintase, efe, DXS, IDI, ou via do MVA em níveis muito mais elevados do que o atualmente encontrado em células que ocorrem naturalmente. Este resultado pode ser realizado pela clonagem seletiva de ácidos nucleicos codificando os polipeptídios em plasmídeos multicópia ou colocando os ácidos nucleicos sob um promotor constitutivo ou induzível forte . Métodos para superexpressão de polipeptídios desejados são comuns e bem-conhecidos na técnica de biologia molecular e exemplos podem ser encontrados em Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor, 1989, que é incorporado aqui por refe-

rência em sua totalidade, especificamente no que diz respeito a técnicas de clonagem.

Os seguintes recursos incluem descrições gerais suplementares, de acordo com metodologia útil de acordo com a invenção: Kreigler, Gene Transfer and Expression; A Laboratory Manual,1990 e Ausubel *et al.*, Eds. Current Protocols in Molecular Biology, 1994, que são incorporadas aqui por referência em sua totalidade, especificamente no que diz respeito à biologia molecular e técnicas de clonagem.

Exemplos de Organismos Fonte

Ácidos nucleicos de isopreno sintase, efe, DXS, IDI, ou via do MVA (e seus polipeptídios codificados) podem ser obtidos de qualquer organismo que naturalmente contém ácidos nucleicos de isopreno sintase, efe, DXS, IDI, e/ou via do MVA. Como observado acima, isopreno é formado naturalmente por uma variedade de organismos, como bactérias, levedura, plantas e animais. Organismos contêm uma via do MVA, Via DXP, ou ambas as via do MVA e DXP para produção de isopreno (As figuras 19A e 19B). Portanto, ácidos nucleicos de DXS podem ser obtidos, por exemplo, a partir de quaisquer organismos que contenham a via DXP ou contêm ambas as vias do MVA e DXP. Ácidos nucleicos de IDI e isopreno sintase podem ser obtidos, por exemplo, a partir de quaisquer organismos que contenham a via do MVA, Via DXP, ou ambas as via do MVA e DXP. Ácidos nucleicos da via do MVA podem ser obtidos, por exemplo, a partir de quaisquer organismos que contenham a via do MVA ou contenham ambas as vias, do MVA e DXP.

Em algumas modalidades, a sequência de ácidos nucleicos de isopreno sintase, efe, DXS, IDI, ou via do MVA nucléica é idêntica à sequência de ácidos nucleicos que é produzida por quaisquer dos seguintes organismos na natureza. Em algumas modalidades, a sequência de aminoácidos de isopreno sintase, efe, DXS, IDI, ou via do MVA de polipeptídios é idêntica à sequência de um polipeptídio que é produzido por quaisquer das seguintes organismos na natureza. Em algumas modalidades, o ácido nucleico ou polipeptídio de isopreno sintase, efe, DXS, IDI, ou via do MVA é um ácido nucleico ou polipeptídio mutante derivado de quaisquer dos organismos descri-

tos aqui. Como utilizado aqui, "derivado de" se refere à fonte do ácido nucleico ou polipeptídio em que uma ou mais mutações são introduzidas. Por exemplo, um polipeptídio que é "derivado de um polipeptídio vegetal" se refere ao polipeptídio de interesse que os resultados da introdução de uma ou mais mutações em uma sequência de um polipeptídio vegetal selvagem (isto é, uma sequência que ocorra na natureza).

Em algumas modalidades, o organismo fonte é um fungo, exemplos dos quais são espécies de *Aspergillus* como *A. oryzae* e *A. niger*, espécies de *Saccharomyces* como *S. cerevisiae*, espécies de *Schizosaccharomyces* como *S. pombe* e espécies de *Trichoderma* como *T. reesei*. Em algumas modalidades, o organismo fonte é uma célula de fungos filamentosos. O termo "fungo filamentoso" se refere a todas as formas filamentosas da subdivisão Eumycotina (ver, Alexopoulos, C. J. (1962), Introductory Mycology, Wiley, New York). Estes fungos são caracterizados por um micélio vegetativo com uma parede celular composta por quitina, celulose e outros polissacarídeos complexos. Os fungos filamentosos são morfológica, fisiológica e geneticamente distintos de leveduras. O crescimento vegetativo de fungos filamentosos ocorre pelo alongamento de hifas e o catabolismo de carbono e obrigatoriamente aeróbico. A célula parental de fungo filamentoso pode ser uma célula de uma espécie de, mas não limitada a, *Trichoderma*, (por exemplo, *Trichoderma reesei*, a forma assexuada de *Hypocrea jecorina*, previamente classificada como *T. longibrachiatum, Trichoderma viride*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma harzianum*) (Sheir-Neirs *et al.*, Appl. Microbiol. Biotechnol 20: 46-53, 1984; ATCC No. 56765 e ATCC No. 26921); *Penicillium* sp., *Humicola* sp. (por exemplo, *H. insolens, H. lanuginose*, ou *H. grisea*); *Chrysosporium* sp. (por exemplo, *C. lucknowense*), *Gliocladium* sp., *Aspergillus* sp. (por exemplo, A. *oryzae, A. niger, A sojae, A. japonicus, A. nidulans,* ou *A. awamori*) (Ward *et al.*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 39: 7380743, 1993 e Goedegebuur *et al.*, Genet 41: 89-98, 2002), *Fusarium* sp., (por exemplo, *F. roseum, F. graminum F. cerealis, F. oxysporuim*, ou *F. venenatum*), *Neurospora* sp., (por exemplo, *N. crassa*), *Hypocrea* sp., *Mucor* sp., (por exemplo, *M. miehei*), *Rhizopus* sp. e *Emericella* sp. (ver também, Innis

et al., Sci. 228: 21-26, 1985). O termo "*Trichoderma*" ou "*Trichoderma sp.*" ou "*Trichoderma spp.*" se refere a qualquer gênero de fungos previamente ou atualmente classificados como *Trichoderma*.

Em algumas modalidades, o fungo é A. nidulans, A. awamori, A. oryzae, A. aculeatus, A. niger, A. japonicus, T. reesei, T. viride, F. oxysporum, ou F. solani. Cepas de Aspergillus são divulgadas em Ward et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 39:738-743, 1993 e Goedegebuur et al., Curr Gene 41:89-98, 2002, que são incorporadas aqui por referência em sua totalidade, especificamente no que diz respeito a fungos. Em modalidades específicas, o fungo é uma cepa de Trichoderma, como a cepa de T. reesei. Cepas de T. reesei são conhecidas e exemplos não limitantes incluem ATCC No. 13631, ATCC No. 26921, ATCC No. 56764, ATCC No. 56765, ATCC No. 56767 e NRRL 15709, que são incorporadas aqui por referência em sua totalidade, especificamente no que diz respeito a cepas de T. reesei. Em algumas modalidades, a cepa do hospedeiro é derivada de RL-P37. RL-P37 é divulgada em Sheir-Neiss et al., Appl. Microbiol. Biotechnology 20:46–53, 1984, que são incorporadas aqui por referência em sua totalidade, especificamente no que diz respeito a cepas de T. reesei.

Em algumas modalidades, o organismo fonte é uma levedura, como *Saccharomyces* sp., *Schizosaccharomyces* sp., *Pichia* sp., ou *Candida* sp.Em algumas modalidades, a *Saccharomyces* sp. é *Saccharomyces cerevisiae*.

Em algumas modalidades, o organismo fonte é uma bactéria, como cepas de *Bacillus* como *B. lichenformis* ou *B. subtilis*, cepas de *Pantoea* como *P. citrea*, cepas de *Pseudomonas* como *P. alcaligenes*, *P. putida, P. syringae,* ou *P. fluorescens,* cepas de *Streptomyces* como *S. lividans* ou *S. rubiginosus*, cepas de *Corynebacterium sp.* como *Corynebacterium glutamicum*, cepas de *Rhodopseudomonas sp.* como *Rhodopseudomonas palustris*, ou cepas de *Escherichia* como *E. coli*.

Como utilizado aqui, "o gênero *Bacillus*" inclui todas as espécies dentro do gênero *"Bacillus,"* conforme conhecidas por aqueles versados na técnica, incluindo, mas não limitado a *B. subtilis, B. licheniformis, B. lentus,*

B. brevis, B. stearothermophilus, B. alkalophilus, B. amyloliquefaciens, B. clausii, B. halodurans, B. megaterium, B. coagulans, B. circulans, B. lautus e *B. thuringiensis*. Reconhece-se que o gênero *Bacillus* continua a passar por reorganização taxonômica. Assim, pretende-se que o gênero inclua espécies que foram reclassificadas, incluindo, mas não limitando a organismos, tais como *B. stearothermophilus*, e que agora se chama "*Geobacillus stearothermophilus*." A produção de endosporos resistentes à presença de oxigênio é considerada a característica definidora de gênero *Bacillus*, embora essa característica também se aplique aos recém-nomeados *Alicyclobacillus, Amphibacillus, Aneurinibacillus, Anoxybacillus, Brevibacillus, Filobacillus, Gracilibacillus, Halobacillus, Paenibacillus, Salibacillus, Thermobacillus, Ureibacillus* e *Virgibacillus*.

Em algumas modalidades, o organismo fonte é uma bactéria gram-positiva. Exemplos não limitantes incluem cepas de *Streptomyces* (por exemplo, *S. lividans, S. coelicolor*, ou *S. griseus*) e *Bacillus*. Em algumas modalidades, o organismo fonte é uma bactéria gram–negativa, como *E. coli, Rhodopseudomonas sp.* como *Rhodopseudomonas palustris* ou *Pseudomonas* sp. como *P. alcaligenes, P. putida, P. syringae,* ou *P. fluorescens.*

Em algumas modalidades, o organismo fonte é a planta, como a planta a partir da família Fabaceae, como a subfamília Faboideae. Em algumas modalidades, o organismo fonte é kudzu, álamo (como *Populus alba* x *tremula* CAC35696), aspen (como *Populus tremuloides*), ou *Quercus robur.*

Em algumas modalidades, o organismo fonte é uma alga, como a alga verde, alga vermelha, glaucófitas, cloraraquiniófitas, euglenídeos, cromista, ou dinoflagelados.

Em algumas modalidades, o organismo fonte é uma cianobactéria, como cianobactérias classificadas em quaisquer dos seguintes grupos com base em morfologia: *Chroococcales, Pleurocapsales, Oscillatoriales, Nostocales*, ou *Stigonematales.*

Exemplos de Células hospedeiras

Uma variedade de células hospedeiras pode ser usada para expressar polipeptídios de isopreno sintase, efe, DXS, IDI, e/ou via do MVA e

para a produção de isopreno nos métodos da invenção reivindicada. Exemplos de células hospedeiras incluem células de quaisquer dos organismos listados na seção anterior sob o título "*Exemplos de Organismos Fonte.*" A célula hospedeira pode ser uma célula que produz naturalmente isopreno ou etileno ou uma célula que não produze naturalmente isopreno ou etileno. Em algumas modalidades, a célula hospedeira produz naturalmente isopreno com o uso da via DXP e ácidos nucleicos de isopreno sintase, DXS, e/ou IDI são adicionados para melhorar a produção de isopreno utilizando esta via. Em algumas modalidades, a célula hospedeira produz naturalmente isopreno com o uso da via do MVA e uma isopreno sintase e/ou um ou mais ácidos nucleicos da via do MVA são adicionados para aumentar a produção de isopreno usando esta via. Em algumas modalidades, a célula hospedeira produz naturalmente isopreno com o uso da via DXP e um ou mais ácidos nucleicos da via do MVA são adicionados para a produção de isopreno usando parte ou toda a via do MVA assim como a via DXP. Em algumas modalidades, a célula hospedeira produz naturalmente isopreno usando tanto a DXP e Via do MVAs e um ou mais isopreno sintase, DXS, IDI, ou ácidos nucleicos de via do MVA são adicionados para aumentar a produção de isopreno por uma ou ambas as vias. Em algumas modalidades, a célula hospedeira produz naturalmente etileno e um ácido nucleico de efe é adicionado para acentuar a produção de etileno.

Exemplos de Métodos de Transformação

Ácidos nucleicos de isopreno sintase, efe, DXS, IDI, e/ou via do MVA ou vetores contendo os mesmos podem ser inseridos em uma célula hospedeira (por exemplo, uma célula vegetal, uma célula fúngica, uma célula de levedura, ou uma célula bacteriana descrita aqui) utilizando técnicas padrão para expressão do polipeptídio codificado de isopreno sintase, efe, DXS, IDI, e/ou via do MVA. A introdução de um construto de DNA ou vetor em uma célula hospedeira pode ser realizada usando técnicas de transformação como, eletroporação, microinjeção nuclear, transdução, transfecção (por exemplo, lipofecção mediada ou transfecção mediada por DEAE-dextrina ou transfecção usando um vírus fago recombinante), incubação com

precipitado DNA por fosfato de cálcio, bombardeio em alta velocidade com microprojéteis revestidos com DNA e fusão de protoplastos. Técnicas de transformação geral são conhecidas na técnica (ver, por exemplo, *Current Protocols em Molecular Biology* (F. M. Ausubel *et al.* (eds) Capítulo 9, 1987; Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor, 1989; e Campbell *et al.*, Curr. Genet. 16:53-56, 1989, que são incorporadas aqui por referência em sua totalidade, especificamente no que diz respeito aos métodos de transformação). A expressão de polipeptídio heterólogo em *Trichoderma* é descrita na Patente U.S. No.6.022.725; Patente U.S. No. 6.268.328; Patente U.S. No. 7.262.041;WO 2005/001036; Harkki *et al.*; Enzyme Microb. Technol. 13:227-233, 1991; Harkki *et al.*, Bio Technol. 7:596-603, 1989; EP 244,234; EP 215,594; e Nevalainen *et al.*, "The Molecular Biology of Trichoderma and its Application to a expression of Both Homologous and Heterologous Genes," em Molecular Industrial Mycology, Eds. Leong e Berka, Marcel Dekker Inc., NY pp. 129 – 148, 1992, que são incorporadas aqui por referência em sua totalidade, especificamente no que diz respeito aos métodos de transformação e expressão). Referência é também feita a Cao *et al.*, (Sci. 9:991–1001, 2000; EP 238023; e Yelton *et al.*, Proceedings. Natl. Acad. Sci. USA 81:1470-1474, 1984 (que são incorporadas aqui por referência em sua totalidade, especificamente no que diz respeito aos métodos de transformação) para transformação de cepas de *Aspergillus*. Os ácidos nucleicos introduzidos podem ser integrados em DNA cromossomal ou mantidos como sequências replicantes extracromossomais.

Qualquer método conhecido na técnica pode ser usado para selecionar transformantes. Em um exemplo não limitante, transformantes adequados incluindo um marcador *amds* são usados para distinguir transformantes inadequados por sua taxa de crescimento mais rápida e formação de colônias circulares com uma superfície lisa, ao invés de contorno irregular em meio de cultura sólido contendo acetamida. Adicionalmente, em alguns casos, um ensaio adicional de estabilidade é conduzido pelo crescimento de transformantes em meio sólido não seletivo (por exemplo, um meio que não tem acetamida), pela coleta de esporos deste meio de cultura e pela deter-

minação da porcentagem de esporos que, posteriormente, germinam e crescem em meio seletivo contendo acetamida.

Em algumas modalidades, células fúngicas são transformadas por um processo de formação de protoplastos e transformação dos protoplastos seguida de regeneração da parede celular de uma maneira conhecida. Em uma modalidade específica, a preparação de *Trichoderma sp.* para a transformação envolve a preparação de protoplastos a partir de micélio de fungos (ver, Campbell *et al.*, Curr. Genet. 16:53-56, 1989, que é incorporada por referência em sua totalidade, especificamente no que diz respeito aos métodos de transformação). Em algumas modalidades, os micélios são obtidos a partir de esporos vegetativos germinados. Os micélios são tratados com uma enzima que digere a parede celular, resultando em protoplastos. Os protoplastos são então protegidos pela presença de um estabilizador osmótico em meio em suspensão. Estes estabilizadores incluem o manitol, sorbitol, cloreto de potássio e sulfato de magnésio e semelhantes. Normalmente, a concentração destes estabilizadores varia entre 0,8 M e 1,2 M. É desejável usar uma solução de cerca de 1,2 M de sorbitol no meio em suspensão.

A captação de DNA na cepa hospedeira de *Trichoderma sp.* depende da concentração de íons cálcio. Geralmente, são usados entre cerca de 10 mM de $CaCl_2$ e 50 mM de $CaCl_2$ em uma solução de captação. Adicionalmente à captação de íons cálcio na solução, outros compostos geralmente incluídos são um sistema tamponante como tampão TE (10 mM de Tris, pH 7,4, 1 mM de EDTA) ou tampão MOPS a 10 mM, pH 6,0 (ácido morfolinopropanossulfônico) e polietileno glicol (PEG). Embora não exista uma intenção de se ligar em nenhuma teoria específica, acredita-se que o polietileno glicol aja para fundir as membranas celulares, permitindo assim que o conteúdo do meio seja distribuído no citoplasma da cepa de *Trichoderma sp.* e o DNA plasmidial seja transferido para o núcleo. Esta fusão frequentemente deixa várias cópias do DNA plasmidial integradas no cromossoma hospedeiro.

Normalmente uma suspensão contendo os protoplastos ou célu-

las de *Trichoderma sp.* que foram submetidos a um tratamento de permeabilidade com uma densidade de 10^5 a 10^7/mL (tal como 2 x 10^6/mL) é utilizada na transformação. Um volume de 100µl desses protoplastos ou células em uma solução adequada (por exemplo, sorbitol a 1,2 M e 50 mM de $CaCl_2$) é misturado com o DNA desejado. Em geral, uma concentração elevada de PEG é adicionada à solução de absorção. Entre 0,1 a 1 volume de PEG 4000 a 25% pode ser adicionado à suspensão de protoplastos. Em algumas modalidades, cerca de 0,25 volumes são adicionados à suspensão de protoplastos. Aditivos, tais como dimetilsulfóxido, heparina, espermidina, cloreto de potássio, e outros também podem ser adicionados à solução de captação, e ajudam na transformação. Procedimentos similares estão disponíveis para outras células hospedeiras fúngicas (ver, por exemplo, Patentes U.S. Nos. 6.022.725 e 6.268.328, que são incorporadas aqui por referência em suas totalidades, em especial no que diz respeito aos métodos de transformação).

Geralmente, a mistura é então cultivada em cerca de 0°C por um período de 10 a 30 minutos. PEG adicional é depois adicionado à mistura para intensificar ainda mais a absorção da sequência de ácidos nucleicos desejada. O PEG 4000 a 25% é geralmente adicionado em volumes de 5 a 15 vezes o volume da mistura de transformação, no entanto, volumes maiores e menores podem ser adequados. O PEG 4000 a 25% é desejavelmente cerca de 10 vezes o volume da mistura de transformação. Depois que o PEG é adicionado, a mistura de transformação é, então, cultivada em temperatura ambiente ou em gelo antes da adição de uma solução de sorbitol e $CaCl_2$. A suspensão de protoplastos é então adicionada às alíquotas fundidas de um meio de crescimento. Quando o meio de crescimento inclui uma seleção de crescimento (por exemplo, acetamida ou um antibiótico), permite-se o crescimento de transformantes apenas.

A transformação de células bacterianas pode ser realizada de acordo com os métodos convencionais, por exemplo, conforme descrito em Sambrook *et al*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor, 1982, que é incorporada aqui por referência na sua totalidade, em parti-

cular no que diz respeito a métodos de transformação.

Meios de Cultura de Células Exemplares

A invenção também inclui uma célula ou uma população de células em cultura que produzem isopreno ou etileno. Por "células em cultura" entende-se duas ou mais células em uma solução (por exemplo, um meio celular) que permite que as células sofram uma ou mais divisões celulares. "Células em cultura" não incluem células vegetais que fazem parte de uma planta multicelular viva contendo células que se diferenciaram em tecidos vegetais. Em várias modalidades, a cultura de células inclui pelo menos cerca de 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1.000, 5.000, 10.000 ou mais células.

Qualquer fonte de carbono pode ser usada para cultivar as células hospedeiras. O termo "fonte de carbono" refere-se a um ou mais compostos contendo carbono, capaz de serem metabolizados por uma célula ou organismo hospedeiro. Por exemplo, o meio de cultura utilizado para cultivar as células hospedeiras pode incluir qualquer fonte de carbono adequada para manter a viabilidade ou o crescimento das células hospedeiras.

Em algumas modalidades, a fonte de carbono é um carboidrato (tal como monossacarídeos, dissacarídeos, oligossacarídeos ou polissacarídeos), açúcar invertido (por exemplo, xarope de sacarose tratado enzimaticamente), glicerol, glicerina (por exemplo, um subproduto glicerina de um biodiesel ou processo de fabricação de sabão), di-hidroxiacetona, fonte de único carbono, óleo (por exemplo, um óleo vegetal ou de planta como o milho, palma ou óleo de soja), gordura animal, óleo de origem animal, ácido graxo (por exemplo, um ácido graxo saturado, ácido graxo insaturado ou ácido graxo poli-insaturado), lipídio, fosfolipídio, glicerolipídio, monoglicerídeo, diglicerídeo, triglicerídeo, polipeptídeo (por exemplo, um peptídeo ou proteína microbiana ou vegetal), fonte de carbono renovável (por exemplo, uma fonte de carbono da biomassa, como uma fonte de carbono da biomassa hidrolisado), extrato de levedura, componente de um extrato de levedura, polímero, ácido, álcool, aldeído, cetona, aminoácido, succinato, lactato, acetato, etanol, ou qualquer combinação de dois ou mais dos supramencionados. Em algumas modalidades, a fonte de carbono é um produto de fotossín-

tese, incluindo, mas não limitado a, glicose.

Monossacarídeos exemplares incluem a glicose e a frutose, oligossacarídeos exemplares incluem lactose e sacarose, e polissacarídeos exemplares incluem amido e celulose. Carboidratos exemplares incluem os açúcares C6 (por exemplo, frutose, galactose, manose ou glicose) e açúcares C5 (por exemplo, xilose ou arabinose). Em algumas modalidades, o meio celular inclui um carboidrato, bem como uma fonte de carbono que não seja um carboidrato (por exemplo, glicerol, glicerina, di-hidroxiacetona, fonte de único carbono, óleo, óleo de origem animal, gordura animal, ácido graxo, lipídio, fosfolipídio, glicerolipídio, monoglicerídeo, diglicerídeo, triglicerídeos, fonte de carbono renovável, ou um componente de um extrato de levedura). Em algumas modalidades, o meio celular inclui um carboidrato, bem como um polipeptídeo (por exemplo, um peptídeo ou proteína microbiana ou vegetal). Em algumas modalidades, o polipeptídeo microbiano é um polipeptídeo de fungos ou bactérias. Em algumas modalidades, o polipeptídeo vegetal é um polipeptídeo de soja, milho, canola, pinhão manso, palma, amendoim, girassol, coco, mostarda, colza, algodão, palmiste, oliva, açafrão, gergelim ou semente de linhaça.

Em algumas modalidades, a concentração de carboidratos é, pelo menos, ou cerca de 5 gramas por litro de caldo (g/L, onde o volume de caldo inclui tanto o volume do meio celular e o volume das células), tal como pelo menos, ou cerca de 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 150, 200, 300, 400, ou mais g/L. Em algumas modalidades, a concentração de carboidratos é de cerca de 50 e cerca de 400 g/L, tal como entre cerca de 100 e cerca de 360 g/L, entre cerca de 120 e cerca de 360 g/L, ou entre cerca de 200 e cerca de 300 g/L. Em algumas modalidades, essa concentração de carboidratos inclui o montante total de carboidrato que é adicionado antes e/ou durante o cultivo das células hospedeiras.

Em algumas modalidades, as células são cultivadas em condições de glicose limitada. Por "condições de glicose limitada", entende-se que a quantidade de glicose que é adicionada é menor que ou cerca de 105% (tal como cerca de 100%) da quantidade de glicose que é consumida pelas

células. Em modalidades particulares, a quantidade de glicose que é adicionada ao meio de cultura é aproximadamente a mesma quantidade de glicose que é consumida pelas células durante um período específico de tempo. Em algumas modalidades, a taxa de crescimento celular é controlada através da limitação da quantidade de glicose adicionada, de tal forma que as células crescem a uma taxa que pode ser suportada pela quantidade de glicose no meio celular. Em algumas modalidades, a glicose não se acumula durante o tempo em que as células são cultivadas. Em várias modalidades, as células são cultivadas em condições de glicose limitada por um período maior ou cerca de 1, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60 ou 70 horas. Em várias modalidades, as células são cultivadas em condições de glicose limitada, por um período maior ou cerca de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95 ou 100% da duração total de tempo que as células são cultivadas. Embora não pretenda ficar vinculado a qualquer teoria em particular, acredita-se que as condições de glicose limitada podem permitir uma regulação mais favorável das células.

Em algumas modalidades, as células são cultivadas na presença de um excesso de glicose. Em modalidades particulares a quantidade de glicose que é adicionada é maior do que cerca de 105% (tal como cerca de ou maior que 110, 120, 150, 175, 200, 250, 300, 400, ou 500%) ou mais da quantidade de glicose que é consumida pelas células durante um período específico de tempo. Em algumas modalidades, a glicose acumula-se durante o tempo em que as células são cultivadas.

Lipídios exemplares são quaisquer substâncias que contenham um ou mais ácidos graxos que são ácidos graxos C4 e superiores, que são saturados, insaturados, ou ramificados.

Óleos exemplares são lipídios que estão líquidos à temperatura ambiente. Em algumas modalidades, os lipídios contêm um ou mais ácidos graxos C4 ou superiores (por exemplo, contêm um ou mais ácidos graxos saturados, insaturados ou ramificados com quatro ou mais carbonos). Em algumas modalidades, o óleo é obtido a partir de soja, milho, canola, pinhão manso, palma, amendoim, girassol, coco, mostarda, colza, algodão, palmis-

te, açafrão, oliva, gergelim, linhaça, células microbianas oleaginosas, sebo chinês, ou qualquer combinação de dois ou mais dos supramencionados.

Ácidos graxos exemplares incluem compostos de fórmula RCO-OH, onde "R" é um hidrocarboneto. Ácidos graxos insaturados exemplares incluem compostos onde o "R" inclui pelo menos uma ligação dupla carbono-carbono. Ácidos graxos insaturados exemplares incluem, mas não estão limitados a, ácido oleico, ácido vacênico, o ácido linoleico, ácido palmitelaídico e araquidônico. Ácidos graxos poli-insaturados exemplares incluem compostos onde o "R" inclui uma pluralidade de ligações duplas carbono-carbono. Ácidos graxos saturados exemplares incluem compostos onde o "R" é um grupo alifático saturado. Em algumas modalidades, a fonte de carbono inclui um ou mais ácidos graxos C_{12}-C_{22}, tais como ácidos graxos saturados C_{12}, um ácido graxo saturado C_{14}, um ácido graxo saturado C_{16}, um ácido graxo saturado C_{18}, um ácido graxo saturado C_{20} ou um ácido graxo saturado C_{22}. Em uma modalidade exemplar, o ácido graxo é o ácido palmítico. Em algumas modalidades, a fonte de carbono é um sal de um ácido graxo (por exemplo, um ácido graxo insaturado), um derivado de um ácido graxo (por exemplo, um ácido graxo insaturado), ou um sal de um derivado de ácido graxo (por exemplo, um ácido graxo insaturado). Sais apropriados incluem, mas não estão limitados a, sais de lítio, sais de potássio, sais de sódio, e assim por diante. Di- e trigliceróis são ésteres de ácidos graxos de glicerol.

Em algumas modalidades, a concentração de lipídio, óleo, gordura, ácido graxo, monoglicerídeo, diglicerídeo, ou triglicerídeos é no mínimo, ou cerca de 1 grama por litro de caldo (g/L, onde o volume de caldo inclui tanto o volume do meio celular e o volume das células), tal como, pelo menos ou cerca de 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 150, 200, 300, 400 g/L ou mais. Em algumas modalidades, a concentração de lipídio, óleo, gordura, ácido graxo, monoglicerídeo, diglicerídeo, ou triglicerídeo é de cerca de 10 e cerca de 400 g/L, tal como entre cerca de 25 e cerca de 300 g/L, entre cerca de 60 e cerca de 180 g/L, ou entre cerca de 75 e cerca de 150 g/L. Em algumas modalidades, a concentração inclui o montante total do lipídio, óleo,

gordura, ácido graxo, monoglicerídeo, diglicerídeo, ou triglicerídeo que é adicionado antes e/ou durante o cultivo das células hospedeiras. Em algumas modalidades, a fonte de carbono inclui (i) um lipídio, óleo, gordura, ácido graxo, monoglicerídeo, diglicerídeo, ou triglicerídeo e (ii) um carboidrato, como a glicose. Em algumas modalidades, a relação de lipídio, óleo, gordura, ácido graxo, monoglicerídeo, diglicerídeo, ou triglicerídeo para o carboidrato é de cerca de 1:1 em uma base de carbono (ou seja, um carbono no lipídio, óleo, gordura, ácido graxo, diglicerídeo, monoglicerídeo ou triglicerídeo por carbono de carboidrato). Em modalidades particulares, a quantidade de lipídio, óleo, gordura, ácido graxo, diglicerídeo, monoglicerídeo ou triglicerídeo é entre cerca de 60 e 180 g/L, e a quantidade de carboidratos é de cerca de 120 e 360 g/L.

Fontes de carbono de polipeptídeo microbiano exemplares incluem um ou mais polipeptídeos de fungos ou bactérias. Fontes de carbono de polipeptídeo de plantas exemplares incluem um ou mais polipeptídeos de soja, milho, canola, pinhão manso, palma, amendoim, girassol, coco, mostarda, colza, algodão, palmiste, açafrão, oliva, gergelim ou semente de linhaça.

Fontes de carbono renováveis exemplares incluem permeado de soro de queijo, água de maceração de milho, melaço de açúcar de beterraba, malte de cevada, e os componentes de qualquer dos anteriores. Fontes de carbono renováveis também incluem glicose, hexose, pentose e xilose, presentes na biomassa, tal como milho, gramínea switchgrass, cana-de-açúcar, resíduos celulares dos processos de fermentação, e subproduto proteico da moagem de soja, milho ou trigo. Em algumas modalidades, a fonte de carbono da biomassa é um material lignocelulósico, hemicelulósico, ou celulósico, tal como, mas não limitados a, um grama, trigo, palha de trigo, bagaço de cana, bagaço de cana-de-açúcar, polpa de madeira macia, milho, sabugo ou casca de milho, grão de milho, fibra de grão de milho, palha de milho, o capim, produto de casca de arroz, ou um subproduto da moagem úmida ou seca de grãos (por exemplo, milho, sorgo, centeio, triticate, cevada, trigo e/ou bagaço de destilação). Materiais celulósicos exemplares inclu-

em madeira, resíduos de polpa e papel, plantas herbáceas e polpa de fruta. Em algumas modalidades, a fonte de carbono inclui toda ou qualquer parte da planta, como caules, grãos, raízes ou tubérculos. Em algumas modalidades, a totalidade ou parte de qualquer das seguintes plantas são usadas como fonte de carbono: milho, trigo, centeio, sorgo, triticate, arroz, milhete, cevada, mandioca, leguminosas, tais como feijão e ervilha, batata, batata-doce, banana, cana-de-açúcar, e/ou tapioca. Em algumas modalidades, a fonte de carbono é um hidrolisado de biomassa, tal como um hidrolisado de biomassa que inclui tanto xilose quanto glicose, ou que inclui tanto sacarose quanto glicose.

Em algumas modalidades, as fontes de carbono renováveis (como biomassa) são pré-tratadas antes de serem adicionadas ao meio de cultura de célula. Em algumas modalidades, o pré-tratamento inclui o pré-tratamento enzimático, pré-tratamento químico, ou uma combinação dos dois pré-tratamentos, enzimático e químico (ver, por exemplo, Farzaneh *et al*, "Bioresource Technology" 96 (18): 2014-2018, 2005; Patente U.S. Nº 6.176.176; Patente U.S. Nº 6.106.888, que são incorporadas aqui por referência em suas totalidades, particularmente com respeito ao pré-tratamento de fontes de carbono renováveis). Em algumas modalidades, a fonte de carbono renovável é parcial ou completamente hidrolisada antes de ser adicionada ao meio de cultura de células.

Em algumas modalidades, a fonte de carbono renovável (tal como palha de milho) sofre pré-tratamento de explosão de fibras com amônia (AFEX) antes de ser adicionada ao meio de cultura de células (ver, por exemplo, Farzaneh *et al.* "Bioresource Technology" 96 (18): 2014-2018, 2005). Durante o pré-tratamento AFEX, uma fonte de carbono renovável é tratada com amônia anidra líquida em temperaturas moderadas (tal como cerca de 60 a cerca de 100°C), e alta pressão (como cerca de 1,72 x 10^6 a cerca de 2,07 x 10^6 Pa (250-300psi)) durante cerca de 5 minutos. Depois, a pressão é rapidamente liberada. Neste processo, efeitos físicos e químicos combinados de solubilização de lignina, hidrólise de hemicelulose, descristalização de celulose, e aumento da área de superfície permitem a conversão

enzimática quase completa de celulose e hemicelulose em açúcares fermentáveis. O pré-tratamento AFEX tem a vantagem de que quase toda a amônia pode ser recuperada e reutilizada, enquanto o restante serve como fonte de nitrogênio para micro-organismos em processos a jusante. Além disso, um fluxo de lavagem não é necessário para o pré-tratamento AFEX. Assim, a recuperação de matéria seca após o tratamento AFEX é essencialmente de 100%. AFEX é basicamente um processo "dry to dry". A fonte de carbono renovável tratada é estável por longos períodos e pode ser alimentada com cargas de sólidos muito altas em hidrólise enzimática, ou processos de fermentação. A celulose e a hemicelulose são bem preservadas no processo AFEX, com pouca ou nenhuma degradação. Não há necessidade de neutralização antes da hidrólise enzimática de uma fonte de carbono renovável que sofreu pré-tratamento AFEX. A hidrólise enzimática das fontes de carbono tratadas com AFEX produz fluxo de açúcar puro para uso posterior em fermentação.

Em algumas modalidades, a concentração da fonte de carbono (por exemplo, uma fonte de carbono renovável) é equivalente a, pelo menos, ou cerca de 0,1, 0,5, 1, 1,5 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40 ou 50% de glicose (p/v). A quantidade equivalente de glicose pode ser determinada por métodos de HPLC padronizados com glicose, como referência para medir a quantidade de glicose gerada a partir da fonte de carbono. Em algumas modalidades, a concentração da fonte de carbono (por exemplo, uma fonte de carbono renovável) é equivalente a entre cerca de 0,1% e cerca de 20% de glicose, tal como entre cerca de 0,1% e cerca de 10% de glicose, entre cerca de 0,5% e cerca de 10% de glicose, entre cerca de 1% e cerca de 10% de glicose, entre cerca de 1% e cerca de 5% de glicose, ou entre cerca de 1% e cerca de 2% de glicose.

Em algumas modalidades, a fonte de carbono inclui extrato de levedura ou um ou mais componentes de extrato de levedura. Em algumas modalidades, a concentração de extrato de levedura é pelo menos 1 grama de extrato de levedura por litro de caldo (g/L, em que o volume de caldo inclui tanto o volume do meio celular e o volume das células), tal como, pelo

menos ou cerca de 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 150, 200, 300, ou mais g/L. Em algumas modalidades, a concentração de extrato de levedura é entre cerca de 1 e cerca de 300 g/L, tal como entre cerca de 1 e cerca de 200 g/L, entre cerca de 5 e cerca de 200 g/L, entre cerca de 5 e cerca de 100 g/L, ou entre cerca de 5 e cerca de 60 g/ L. Em algumas modalidades, a concentração inclui o montante total de extrato de levedura que é adicionado antes e/ou durante o cultivo das células hospedeiras. Em algumas modalidades, a fonte de carbono inclui tanto o extrato de levedura (ou um ou mais componentes do mesmo) e outra fonte de carbono, como a glicose. Em algumas modalidades, a razão de extrato de levedura para a outra fonte de carvão é de cerca de 1:5, cerca de 1:10, ou cerca de 1:20 (p/p).

Além disso, a fonte de carbono também pode ser substrato de único carbono tais como o dióxido de carbono, ou o metanol. A produção de glicerol a partir de fontes de único carbono (por exemplo, metanol, formaldeído, ou formiato) tem sido relatada em leveduras metilotróficas (Yamada *et al.* "Agric. Biol. Chem.", 53 (2) 541-543, 1989, que é incorporada aqui por referência na sua totalidade, particularmente com respeito a fontes de carbono) e em bactérias (Hunter *et al.* "Biochemistry", 24, 4148-4155, 1985, que é incorporada aqui por referência em sua totalidade, particularmente com respeito a fontes de carbono). Estes organismos podem assimilar compostos de único carbono, variando em estado de oxidação do metano para o formiato, e produzem glicerol. A via de assimilação de carbono pode ser através de ribulose monofosfato, através de serina, ou através de xilulose-momofosfato (Gottschalk, Bacterial Metabolism, Segunda edição, Springer-Verlag: Nova Iorque, 1986, que é incorporado aqui por referência na sua totalidade, particularmente no que diz respeito às fontes de carbono). A via da ribulose monofosfato envolve a condensação de formiato com ribulose-5-fosfato para formar um açúcar de seis carbonos, que torna-se frutose e, eventualmente, o produto de três carbonos, gliceraldeído-3-fosfato. Da mesma forma, a via da serina assimila o composto de único carbono na via glicolítica através do metilenotetra-hidrofolato.

Além de substratos de um e dois carbonos, os organismos meti-

lotróficos também são conhecidos por utilizar um número de outros compostos contendo carbono, como a metilamina, glicosamina e uma variedade de aminoácidos para a atividade metabólica. Por exemplo, as leveduras metilotróficas são conhecidas por utilizar o carbono da metilamina para formar trealose ou glicerol (Bellion *et al*, "Microb. Growth Cl Compd.", [Int. Symp.], 7 [a] ed., 415-32. Editores:Murrell *et al*, Editora:. Intercept, Andover, Reino Unido, 1993, que é incorporada aqui por referência, na sua totalidade, particularmente com respeito a fontes de carbono). Da mesma forma, diversas espécies de *Candida* metabolizam o ácido oleico ou alanina (Sulter *et al.* Arch. Microbiol. 153 (5), 485-9, 1990, que é incorporado por referência na sua totalidade, particularmente com respeito a fontes de carbono).

Em algumas modalidades, as células são cultivadas em um meio padrão contendo sais fisiológicos e nutrientes (ver, por exemplo, Pourquie, J. *et al.*, "Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation", eds. Aubert *et al.* Academic Press, pp. 71-86, 1988 e Ilmen *et al.* Appl. Environ. Microbiol. 63:1298-1306, 1997, sendo cada uma delas incorporados aqui por referência em suas totalidades, em especial no que diz respeito aos meios celulares). Meios de cultura exemplares são meios comercialmente preparados comuns, como caldo Luria Bertani (LB), caldo Sabouraud Dextrose (DP), ou caldo de meio de levedura (YM). Outros meios de crescimento definidos ou sintéticos também podem ser usados, e o meio adequado para o crescimento das células hospedeiras particulares, são conhecidos por alguém versado na técnica da ciência da microbiologia ou da fermentação.

Em adição a uma fonte de carbono adequada, o meio celular desejavelmente contém minerais adequados, sais, cofatores, tampões e outros componentes conhecidos por aqueles versados na técnica apropriada para o crescimento das culturas, ou o aumento da produção de isopreno (ver, por exemplo, WO 2004/033646 e referências citadas nele, e WO 96/35796 e referências citadas, sendo elas incorporadas aqui por referência, em suas totalidades, em especial no que diz respeito a condições de meios celulares e de cultura de células). Em algumas modalidades, onde um isopreno sintase, DXS, IDI, e/ou ácido nucleico da via do MVA está sob o con-

trole de um promotor induzível, o agente indutor (por exemplo, açúcar, sal de metal ou antimicrobiano), é desejavelmente adicionado ao meio em uma concentração eficaz para induzir a expressão de um isopreno sintase, DXS, IDI e/ou polipeptídeo da via do MVA. Em algumas modalidades, o meio celular tem um antibiótico (como a canamicina), que corresponde ao ácido nucleico resistente ao antibiótico (tal como um ácido nucleico resistente à canamicina) em um vetor que tem um ou mais DXS, IDI, ou ácidos nucleicos da via do MVA.

Condições de Cultura de Células Exemplares

Os materiais e os métodos adequados para a manutenção e o crescimento de culturas bacterianas são bem-conhecidos no estado da técnica. Técnicas exemplares podem ser encontradas em Manual of Methods for General Bacteriology Gerhardt *et al.*, eds, American Society for Microbiology, Washington, D.C. (1994) ou Brock em Biotechnology: A textbook of Industrial Microbiology', segunda edição (1989) Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA, sendo cada uma delas incorporadas aqui por referência em suas totalidades, em especial no que diz respeito às técnicas de cultura de células. Em algumas modalidades, as células são cultivadas em meio de cultura sob condições que permitam a expressão de um ou mais isopreno sintase, efe, DXS, IDI, ou polipeptídeos da via do MVA codificados por um ácido nucleico inserido na célula hospedeira.

Condições de cultura de células padrão podem ser usadas para cultivar as células (ver, por exemplo, WO 2004/033646 e referências citadas no mesmo, sendo cada uma delas incorporadas aqui por referência em suas totalidades, em especial no que diz respeito às condições de cultura de células e de fermentação). As células são cultivadas e mantidas a uma temperatura, mistura de gases e pH adequados (tal como em cerca de 20 a cerca de 37°C, em cerca de 6% a cerca de 84% de CO_2, e com um pH entre cerca de 5 a cerca de 9). Em algumas modalidades, as células são crescidas a 35°C em meio celular apropriado. Em algumas modalidades, por exemplo, as culturas são cultivadas a aproximadamente 28°C em meio apropriado, em culturas ou fermentadores com agitação, até a quantidade desejada de produ-

ção de isopreno ser alcançada. Em algumas modalidades, a faixa de pH para fermentação é entre cerca de pH 5,0 a cerca de pH 9,0 (tal como cerca de pH 6,0 a cerca de pH 8,0, ou cerca de 6,5 a cerca de 7,0). As reações podem ser realizadas em condições aeróbias, anóxicas ou anaeróbias com base nos requisitos das células hospedeiras. Condições de cultura exemplares para um dado fungo filamentoso são conhecidas no estado da técnica, e podem ser encontradas na literatura científica, e/ou em fonte de fungos, tal como a *American Type Culture Collection* e *Fungal Genetics Stock Center*.

Em várias modalidades, as células são cultivadas utilizando qualquer modo conhecido de fermentação, tal como batelada, batelada alimentada ou processos contínuos. Em algumas modalidades, um método de batelada de fermentação é usado. A fermentação em batelada clássica é um sistema fechado, onde a composição do meio é definida no início da fermentação e não está sujeita às alterações artificiais durante a fermentação. Assim, no início da fermentação o meio de cultura é inoculado com as células hospedeiras desejadas e a fermentação é permitida a ocorrer sem acrescentar nada ao sistema. Normalmente, no entanto, a fermentação em "batelada" é batelada em relação à adição da fonte de carbono e as tentativas são muitas vezes feitas em fatores de controle, tais como pH e concentração de oxigênio. Em sistemas de batelada, as composições de metabólitos e de biomassa do sistema mudam constantemente até que o tempo de fermentação seja interrompido. Dentro de culturas em batelada, as células moderam através de uma fase lag estática para uma fase log de alto crescimento e, finalmente, para uma fase estacionária, onde a taxa de crescimento é reduzida ou interrompida. Em algumas modalidades, as células em fase log são responsáveis pela maior parte da produção de isopreno. Em algumas modalidades, as células em fase estacionária produzem isopreno. Em algumas modalidades, as células em fase log são responsáveis pela maior parte da produção de etileno. Em algumas modalidades, as células em fase estacionária produzem etileno.

Em algumas modalidades, uma variação no sistema de batelada padrão é usada, tal como o sistema de batelada alimentada. Processos de

fermentação em batelada alimentada compreendem um sistema de batelada típico, com a ressalva de que a fonte de carbono é adicionada em incrementos, como os progressos de fermentação. Sistemas de batelada alimentada são úteis quando a repressão catabólica é apta a inibir o metabolismo das células e onde é desejável ter quantidades limitadas de fonte de carbono no meio celular. Fermentações em batelada alimentada podem ser feitas com a fonte de carbono (por exemplo, glicose) em uma quantidade limitada ou em excesso. A medição da concentração real da fonte de carbono em sistemas de batelada alimentada é difícil e é, portanto, estimadas com base nas alterações dos fatores mensuráveis, como pH, oxigênio dissolvido, e a pressão parcial de gases residuais como o CO_2. Fermentações em batelada e batelada alimentada são comuns e bem-conhecidas no estado da técnica e exemplos podem ser encontrados em Brock, "Biotechnology: A textbook of Industrial Microbiology", segunda edição (1989) Sinauer Associates, Inc., que é incorporado aqui por referência em sua totalidade, particularmente com respeito às condições de cultura de células e de fermentação.

Em algumas modalidades, métodos de fermentação contínua são usados. A fermentação contínua é um sistema aberto onde um meio de fermentação definido é acrescentado continuamente a um biorreator, e uma quantidade igual de meio condicionado é removido, ao mesmo tempo, para processamento. A fermentação contínua geralmente mantém as culturas com uma densidade elevada e constante, onde as células estão primariamente na fase log de crescimento.

A fermentação contínua possibilita a modulação de um fator ou qualquer número de fatores que afetam o crescimento celular ou a produção de isopreno. Por exemplo, um método mantém um nutriente limitante, tal como a fonte de carbono ou o nível de nitrogênio, a uma taxa fixa e permite que todos os outros parâmetros moderem. Em outros sistemas, uma série de fatores que afetam o crescimento podem ser alterados continuamente, enquanto a concentração de células (por exemplo, a concentração medida pela turvação do meio) é mantida constante. Sistemas contínuos esforçam-se para manter as condições de crescimento no estado estacionário. Assim,

a perda de células devido ao meio que está sendo retirado, é equilibrada com a taxa de crescimento celular na fermentação. Métodos de modulação de nutrientes e fatores de crescimento para processos de fermentação contínua, bem como técnicas para maximizar a taxa de formação do produto são bem-conhecidos no estado da técnica da microbiologia industrial e uma variedade de métodos são detalhados por Brock, Biotechnology: A textbook of Industrial Microbiology, Segunda Edição (1989) Sinauer Associates, Inc., que é incorporada aqui por referência em sua totalidade, particularmente com respeito às condições de cultura de células e de fermentação.

Em algumas modalidades, as células são imobilizadas em um substrato, como catalisadores de células inteiras, e submetidas a condições de fermentação para a produção de isopreno ou etileno.

Em algumas modalidades, garrafas de cultura líquida são colocadas em agitadores, a fim de introduzir oxigênio ao líquido e manter a uniformidade da cultura. Em algumas modalidades, uma incubadora é usada para controlar a temperatura, umidade, velocidade de agitação e/ou outras condições em que uma cultura é crescida. As incubadoras mais simples são caixas isoladas com um aquecedor regulável, geralmente vai até ~ 65°C. Incubadoras mais elaboradas também podem incluir a capacidade de diminuir a temperatura (através de refrigeração), ou a capacidade de controlar os níveis de umidade ou CO_2. A maioria das incubadoras inclui um temporizador, alguns também podem ser programados para percorrer diferentes temperaturas, níveis de umidade, etc. Incubadoras podem variar em tamanho desde o tamanho de um tampo de mesa a unidades do tamanho de salas pequenas.

Se desejado, uma porção ou todo o meio celular pode ser alterado para repor os nutrientes e/ou evitar o acúmulo de subprodutos metabólicos potencialmente prejudiciais, e de células mortas. No caso de culturas em suspensão, as células podem ser separadas do meio por centrifugação ou filtragem da cultura em suspensão e, posterior ressuspensão das células em novo meio. No caso das culturas aderentes, o meio pode ser removido diretamente por sucção e substituído. Em algumas modalidades, o meio ce-

lular permite pelo menos uma porção das células se dividir, pelo menos, ou cerca de 5, 10, 20, 40, 50, 60, 65 ou mais divisões celulares em uma cultura contínua (tal como uma cultura contínua sem diluição).

Em algumas modalidades, um promotor constitutivo ou de indução ("leaky") (como um promotor Trc) é usado e um composto (como IPTG) não é adicionado para induzir a expressão da isopreno sintase, efe, DXS, IDI, ou ácido (s) nucleico (s) da via do MVA operativamente ligado ao promotor. Em algumas modalidades, um composto (como IPTG) é adicionado para induzir a expressão da isopreno sintase, efe, DXS, IDI, ou ácido(s) nucleico(s) da via do MVA operativamente ligado ao promotor.

Métodos Exemplares de Desacoplamento entre a Produção de Isopreno do Crescimento Celular

Desejavelmente, o carbono da matéria-prima é convertido em isopreno ao invés de usado para o crescimento e manutenção das células. Em algumas modalidades, as células são cultivadas a uma baixa para OD_{600} médio, então a produção de isopreno é iniciada ou aumentada. Esta estratégia permite que uma grande parte do carbono seja convertida em isopreno.

Em algumas modalidades, as células atingem uma densidade ótica de tal ordem que não se dividem mais, ou dividem-se de forma extremamente lenta, mas continuam a fazer isopreno por várias horas (tal como, cerca de 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30 ou mais horas). Por exemplo, figuras 60A-67C mostram que as células podem continuar a produzir uma quantidade substancial de ácido mevalônico ou isopreno após as células atingirem uma densidade ótica de tal forma que não se dividem mais ou dividem-se de forma extremamente lenta. Em alguns casos, a densidade ótica a 550 nm diminui ao longo do tempo (tal como uma diminuição na densidade ótica após as células não estarem mais em uma fase de crescimento exponencial devido à lise celular), e as células continuam a produzir uma quantidade substancial de ácido mevalônico ou isopreno. Em algumas modalidades, a densidade ótica a 550 nm das células aumenta pelo menos ou cerca de 50% (tal como pelo menos, ou cerca de 40, 30, 20, 10, 5 ou 0%) durante um determinado período de tempo (tal como maior ou cerca de 5, 10, 15, 20, 25,

30, 40, 50 ou 60 horas), e as células produzem isopreno em maior ou cerca de 1, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000, 1.250, 1.500, 1.750, 2.000, 2.500, 3.000, 4.000, 5.000, ou mais nmols de isopreno/grama de células para o peso úmido das células/hora (nmol/g_{wcm}/h) durante este período de tempo. Em algumas modalidades, a quantidade de isopreno esta entre cerca de 2 a cerca de 5.000 nmol/g_{wcm}/h, tal como entre cerca de 2 a cerca de 100 nmol/g_{wcm}/h, cerca de 100 a cerca de 500 nmol/ g_{wcm}/h, cerca de 150 a cerca de 500 nmol/g_{wcm}/h, cerca de 500 a cerca de 1.000 nmol/g_{wcm}/h, cerca de 1.000 a cerca de 2.000 nmol/g_{wcm}/h, ou cerca de 2.000 a cerca de 5.000 nmol/g_{wcm}/h. Em algumas modalidades, a quantidade de isopreno está entre cerca de 20 a cerca de 5.000 nmol/g_{wcm}/h, cerca de 100 a cerca de 5.000 nmol/g_{wcm}/h, cerca de 200 a cerca de 2.000 nmol/g_{wcm}/h, cerca de 200 a cerca de 1.000 nmol/g_{wcm}/h, cerca de 300 a cerca de 1.000 nmol/g_{wcm}/h, ou cerca de 400 a cerca de 1.000 nmol/g_{wcm}/h.

Em algumas modalidades, a densidade ótica a 550 nm das células aumenta pelo menos ou cerca de 50% (tal como pelo menos ou cerca de 40, 30, 20, 10, 5 ou 0%) durante um determinado período de tempo (tal como maior ou cerca de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 ou 60 horas), e as células produzem um título cumulativo (quantidade total) de isopreno maior ou cerca de 1, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000, 1.250, 1.500, 1.750, 2.000, 2.500, 3.000, 4.000, 5.000, 10.000, 50.000, 100.000, ou mais mg de isopreno/L de caldo (mg/L_{caldo}, em que o volume de caldo inclui o volume das células e do meio celular) durante este período de tempo. Em algumas modalidades, a quantidade de isopreno é entre cerca de 2 a cerca de 5.000 mg/ L_{caldo}, tal como entre cerca de 2 a cerca de 100 mg/L_{caldo}, cerca de 100 a cerca de 500 mg/L_{caldo}, cerca de 500 a cerca de 1.000 mg/L_{caldo}, cerca de 1000 a cerca de 2.000 mg/L_{caldo}, ou cerca de 2.000 a cerca de 5.000 mg/L_{caldo}. Em algumas modalidades, a quantidade de isopreno é entre cerca de 20 a cerca de 5.000 mg/ L_{caldo}, cerca de 100 a cerca de 5.000 mg/L_{caldo}, cerca de 200 a cerca de 2.000 mg/ L_{caldo}, cerca de 200 a cerca de 1.000 mg/L_{caldo}, cerca de 300 a cerca de 1.000 mg/ L_{caldo}, ou

cerca de 400 a cerca de 1.000 mg/L_{caldo}.

Em algumas modalidades, a densidade ótica a 550 nm das células aumenta pelo menos ou cerca de 50% (tal como pelo menos ou cerca de 40, 30, 20, 10, 5 ou 0%) durante um determinado período de tempo (tal como maior ou cerca de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 ou 60 horas), e as células convertem mais ou cerca de 0,0015, 0,002, 0,005, 0,01, 0,02, 0,05, 0,1, 0,12, 0,14, 0,16, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,2, 1,4, 1,6, 1,8, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0 ou 8,0 % do carbono no meio de cultura de células em isopreno durante este período de tempo. Em algumas modalidades, a percentagem de conversão de carbono em isopreno é entre tais como cerca de 0,002 a cerca de 4,0%, cerca de 0,002 a cerca de 3,0%, cerca de 0,002 a cerca de 2,0%, cerca de 0,002 a cerca de 1,6%, cerca de 0,002 a cerca de 0,005%, cerca de 0,005 a cerca de 0,01%, cerca de 0,01 a cerca de 0,05%, cerca de 0,05 a cerca de 0,15%, 0,15 a cerca de 0,2%, cerca de 0,2 a cerca de 0,3%, cerca de 0,3 a cerca de 0,5%, cerca de 0,5 a cerca de 0,8%, cerca de 0,8 para cerca de 1,0%, ou cerca de 1,0 a cerca de 1,6%. Em algumas modalidades, a percentagem de conversão de carbono em isopreno é entre cerca de 0,002 a cerca de 0,4%, de 0,002 a cerca de 0,16%, 0,04 a cerca de 0,16%, cerca de 0,005 a cerca de 0,3%, cerca de 0,01 a cerca de 0,3%, ou cerca de 0,05 a cerca de 0,3%.

Em algumas modalidades, o isopreno é produzido apenas na fase estacionária. Em algumas modalidades, o isopreno é produzido tanto na fase de crescimento quanto na fase estacionária. Em várias modalidades, a quantidade de isopreno produzido (tal como a quantidade total de isopreno produzido ou a quantidade de isopreno produzido por litro de caldo por hora, por OD_{600}) durante a fase estacionária é maior ou cerca de 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50 ou mais vezes a quantidade de isopreno produzido durante a fase de crescimento para o mesmo período de tempo. Em várias modalidades, maior ou cerca de 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 99% ou mais da quantidade total de isopreno, que é produzido (tal como a produção de isopreno durante uma fermentação por um determinado período de tempo, como 20 horas) é produzido enquanto as células estão na fase estacionária.

Em várias modalidades, maior ou cerca de 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 99% ou mais da quantidade total de isopreno que é produzido (tal como a produção de isopreno durante uma fermentação por um determinado período de tempo, como 20 horas) é produzido enquanto as células dividem-se de forma lenta ou não se dividem, de tal forma que a densidade ótica a 550 nm das células aumenta pelo menos ou cerca de 50% (tal como pelo menos ou cerca de 40, 30, 20, 10, 5 ou 0%). Em algumas modalidades, o isopreno é produzido apenas na fase de crescimento.

Em algumas modalidades, um ou mais ácidos nucleicos da via do MVA, IDI, DXP, ou isopreno sintase são colocados sob o controle de um promotor ou fator que é mais ativo na fase estacionária do que na fase de crescimento. Por exemplo, um ou mais ácidos nucleicos da via do MVA, IDI, DXP, ou isopreno sintase podem ser colocados sob controle de um fator sigma de fase estacionária, tal como RpoS. Em algumas modalidades, um ou mais ácidos nucleicos da via do MVA, IDI, DXP, ou isopreno sintase são colocados sob controle de um promotor induzível em fase estacionária, tal como um promotor induzível por um regulador de resposta ativa em fase estacionária.

Produção de Isopreno dentro de Intervalos de Operação Seguros

A produção de isopreno dentro de níveis seguros de operação de acordo com suas características de inflamabilidade simplifica o projeto e construção de instalações comerciais, melhora vastamente a capacidade de operar com segurança, e limita o potencial para a ocorrência de incêndios. Em particular, os intervalos ideais para a produção de isopreno estão dentro da zona segura, ou seja, o intervalo não inflamável de concentrações de isopreno. Em um aspecto, a invenção expõe um método para a produção de isopreno dentro do intervalo não inflamável de concentrações de isopreno (fora do envoltório de inflamabilidade do isopreno).

Assim, testes experimentais e de modelagem computacional foram utilizados para determinar os limites de inflamabilidade do isopreno (tal como isopreno na presença de O_2, CO_2, N_2, ou qualquer combinação de dois ou mais dos gases anteriores), a fim de garantir um processo seguro. O en-

voltório de inflamabilidade é caracterizado pelo limite de inflamabilidade inferior (LFL), o limite de inflamabilidade superior (UFL), a concentração de oxigênio limitante (LOC), e a temperatura limitante. Para que um sistema seja inflamável, uma quantidade mínima de combustível (tal como isopreno) deve estar na presença de uma quantidade mínima de oxidante, normalmente o oxigênio. A LFL é a quantidade mínima de isopreno que deve estar presente para sustentar a queima, enquanto o UFL é a quantidade máxima de isopreno que pode estar presente. Acima deste limite, a mistura é rica em combustível e a fração de oxigênio é muito baixa para ter uma mistura inflamável. A LOC indica a fração mínima de oxigênio que também deve estar presente para ter uma mistura inflamável. A temperatura limite é baseada no ponto de fulgor do isopreno, e é a mais baixa temperatura em que a combustão do isopreno pode se propagar. Esses limites são específicos para a concentração de isopreno, tipo e concentração de oxidantes, inertes presentes no sistema, temperatura e pressão do sistema. Composições que se enquadram dentro dos limites da curva envelope de inflamabilidade propagam combustão e requerem precauções de segurança adicionais, tanto no projeto quanto na operação dos equipamentos de processo.

As seguintes condições foram testadas através de simulação computacional, análise matemática e testes experimentais. Se desejado, outras condições (tais como outra temperatura, pressão e composições de gás permanentes) podem ser testadas usando os métodos descritos neste documento, para determinar as concentrações de LFL, UFL e de LOC.

(1) Simulação computacional e Análise matemática

Conjunto de Teste 1:

isopreno: 0% em peso - 14% em peso

O_2: 6% em peso - 21% em peso

N_2: 79% em peso - 94% em peso

Conjunto de Teste 2:

isopreno: 0% em peso - 14% em peso

O_2: 6% em peso - 21% em peso

N_2: 79% em peso - 94% em peso

Saturado com H_2O

Conjunto de Teste 3:

isopreno: 0% em peso - 14% em peso

O_2: 6% em peso - 21% em peso

N_2: 79% em peso - 94% em peso

CO_2: 5% em peso - 30% em peso

(2) Testes experimentais para determinação final dos limites de inflamabilidade

Conjunto de Teste 1:

isopreno: 0% em peso - 14% em peso

O_2: 6% em peso - 21% em peso

N_2: 79% em peso - 94% em peso

Conjunto de Teste 2:

isopreno: 0% em peso - 14% em peso

O_2: 6% em peso - 21% em peso

N_2: 79% em peso - 94% em peso

Saturado com H_2O

O *software* de simulação foi usado para dar uma estimativa das características de inflamabilidade do sistema para diversas condições de teste diferentes. O CO_2 não apresentou efeito significativo sobre os limites de inflamabilidade do sistema. Testes suite 1 e 2 foram confirmados por testes experimentais. Os resultados da modelagem estavam alinhados com os resultados do teste experimental. Apenas pequenas variações foram encontradas com a adição de água.

A LOC foi determinada a 9,5% de volume para uma mistura de isopreno, O_2, N_2, e CO_2 a 40ºC e 1 atmosfera. A adição de até 30% de CO_2 não afetou significativamente as características de inflamabilidade da mistura de isopreno, O_2, e N_2. Apenas pequenas variações nas características de inflamabilidade foram mostradas entre um sistema de N_2, O_2 e isopreno saturado hidratado e seco. A temperatura limite é de cerca de -54°C. Temperaturas abaixo de cerca de -54°C são demasiado baixas para propagar a combustão do isopreno.

Em algumas modalidades, a LFL dos intervalos de isopreno de cerca de 1,5% em vol. a cerca de 2,0% em vol., e a UFL dos intervalos de isopreno a partir de cerca de 2,0% em vol. a cerca de 12,0% em vol., depende da quantidade de oxigênio no sistema. Em algumas modalidades, a LOC é cerca de 9,5% em vol. de oxigênio. Em algumas modalidades, a LFL de isopreno é entre cerca de 1,5% em vol. a cerca de 2,0% em vol., a UFL de isopreno é entre cerca de 2,0% em vol. a cerca de 12,0% em vol., e a LOC é cerca de 9,5% em vol. de oxigênio quando a temperatura está entre cerca de 25°C a cerca de 55°C (tal como cerca de 40°C) e a pressão está entre cerca de 1 atmosfera a 3 atmosferas.

Em algumas modalidades, o isopreno é produzido na presença de menos de cerca de 9,5% em vol. de oxigênio (ou seja, abaixo da LOC necessária para ter uma mistura inflamável de isopreno). Em algumas modalidades nas quais é produzido o isopreno na presença de maior ou cerca de 9,5% em vol. de oxigênio, a concentração de isopreno está abaixo da LFL (tal como abaixo de cerca de 1,5% em vol.). Por exemplo, a quantidade de isopreno pode ser mantida abaixo da LFL, diluindo a composição do isopreno com um gás inerte (por exemplo, adicionando, periodicamente ou continuamente, um gás inerte, como nitrogênio, para manter a composição de isopreno abaixo da LFL). Em algumas modalidades nas quais o isopreno é produzido na presença de oxigênio, maior ou cerca de 9,5% em vol., a concentração de isopreno está acima da UFL (tal como acima de cerca de 12% em vol.). Por exemplo, a quantidade de isopreno pode ser mantida acima da UFL por meio de um sistema (tal como qualquer um dos sistemas de cultura de células descritos aqui) que produz isopreno em uma concentração acima da UFL. Se desejado, um nível relativamente baixo de oxigênio pode ser usado para que a UFL também seja relativamente baixa. Neste caso, uma menor concentração de isopreno é necessária para se manter acima da UFL.

Em algumas modalidades nas quais o isopreno é produzido na presença de mais do que cerca 9,5% em volume de oxigênio, a concentração de isopreno está dentro do envelope de inflamabilidade (tal como, entre

o LFL e o UFL). Em algumas modalidades, quando a concentração de isopreno pode cair dentro do envelope de inflamabilidade, uma ou mais etapas são realizadas para reduzir a probabilidade de um incêndio ou explosão. Por exemplo, uma ou mais fontes de ignição (tais como todos os materiais que podem gerar uma faísca) podem ser evitadas. Em algumas modalidades, uma ou mais etapas são realizadas para reduzir a quantidade de tempo que a concentração de isopreno permanece dentro do envelope de inflamabilidade. Em algumas modalidades, um sensor é usado para detectar quando a concentração de isopreno está próxima ou dentro do envelope de inflamabilidade. Se desejar, a concentração de isopreno pode ser medida em um ou mais pontos do tempo durante a cultura de células, e as condições de cultura de células e/ou a quantidade de gás inerte que pode ser ajustada usando métodos padrão, se a concentração de isopreno está próxima ou dentro do envelope de inflamabilidade. Em modalidades particulares, as condições de cultura de células (tais como condições de fermentação) são ajustadas para diminuir a concentração de isopreno abaixo da concentração do LFL ou aumentar a concentração de isopreno acima da concentração do UFL. Em algumas modalidades, a quantidade de isopreno é mantida abaixo do LFL pela diluição da composição de isopreno com um gás inerte (tal como pela adição de forma contínua ou periódica de um gás inerte para manter a composição de isopreno abaixo do LFL).

Em algumas modalidades, a quantidade de voláteis inflamáveis diferentes de isopreno (tal como um ou mais açúcares) é de pelo menos cerca de 2, 5, 10, 50, 75 ou 100 vezes menor que a quantidade de isopreno produzida. Em algumas modalidades, a porção da fase gasosa diferente do gás isopreno compreende entre cerca de 0% a cerca de 100% (volume) de oxigênio, tal como entre cerca de 0% a cerca de 10%, cerca de 10% a cerca de 20%, cerca de 20% a cerca de 30%, cerca de 30% a cerca de 40%, cerca de 40% a cerca de 50%, cerca de 50% a cerca de 60%, cerca de 60% a cerca de 70%, cerca de 70% a cerca de 80%, cerca de 80% a cerca de 90%, ou cerca de 90% a cerca de 100% (volume) de oxigênio. Em algumas modalidades, a porção da fase gasosa diferente de gás isopreno compreende entre

cerca de 0% a cerca de 99% (volume) de nitrogênio, tal como entre cerca de 0% a cerca de 10%, cerca de 10% a cerca de 20%, cerca de 20% a cerca de 30%, cerca de 30% a cerca de 40%, cerca de 40% a cerca de 50%, cerca de 50% a cerca de 60%, cerca de 60% a cerca de 70%, cerca de 70% a cerca de 80%, cerca de 80% a cerca de 90%, ou cerca de 90% a cerca de 99% (volume) de nitrogênio.

Em algumas modalidades, a porção da fase gasosa diferente do gás isopreno compreende entre cerca de 1% a cerca de 50% (volume) de CO2, tal como entre cerca de 1% a cerca de 10%, cerca de 10% a cerca de 20%, cerca de 20% a cerca de 30%, cerca de 30% a cerca de 40%, ou cerca de 40% a cerca de 50% (volume) de CO_2.

Em algumas modalidades, uma composição de isopreno também contém etanol. Por exemplo, o etanol pode ser usado para destilação extrativa de isopreno, resultando em composições (como correntes de produto intermédio) que incluem tanto etanol quanto o isopreno. Desejavelmente, a quantidade de etanol está fora da curva envelope de inflamabilidade para o etanol. A LOC de etanol é de cerca de 8,7% em vol, e o LFL para o etanol é de cerca de 3,3% em vol em condições padrão, tal como cerca de 1 atmosfera e cerca de (60°F) 15,55°C (NFPA 69 Standard on Prevention Systems, edição 2008, que é incorporado aqui por referência na sua totalidade, particularmente com respeito a LOC, LFL, e os valores de UFL). Em algumas modalidades, as composições que incluem isopreno e etanol são produzidas na presença de menos do que o LOC requerido para ter uma mistura inflamável de etanol (tal como menos de cerca de 8,7% em vol.). Em algumas modalidades em que as composições que incluem isopreno e etanol são produzidas na presença de mais do que a, ou em aproximadamente na, LOC requerida para ter uma mistura inflamável de etanol, a concentração de etanol está abaixo do LFL (tal como a menos de cerca de 3,3 % em vol.) .

Em várias modalidades, a quantidade de oxidante (como o oxigênio) está abaixo da LOC de qualquer combustível no sistema (como isopreno ou etanol). Em várias modalidades, a quantidade de oxidante (como o oxigênio) é menor que a cerca de 60, 40, 30, 20, 10 ou 5% da LOC de iso-

preno ou etanol. Em várias modalidades, a quantidade de oxidante (como o oxigênio) é menor que a LOC do isopreno ou etanol, pelo menos, 2, 4, 5 ou mais pontos percentuais absolutos (% em vol). Em modalidades particulares, a quantidade de oxigênio é de pelo menos 2 pontos percentuais absolutos (% em vol) menos do que a LOC do isopreno ou etanol (tal como uma concentração de oxigênio menor que 7,5% em vol, quando a LOC do isopreno é de 9,5% em vol). Em várias modalidades, a quantidade de combustível (como isopreno ou etanol) é menor que, ou cerca de, 25, 20, 15, 10 ou 5% do LFL para esse combustível.

Produção e Recuperação de Alta Eficiência de Isopreno, um Hidrocarboneto Volátil, por Fermentação

Adicionalmente, são aqui fornecidos métodos para a produção e recuperação de alta eficiência de voláteis como isopreno usando taxas de pulverização de gás reduzidas. O uso de taxas de pulverização de gás reduzidas facilita a recuperação de isopreno e outros voláteis (como etileno) pelo aumento da concentração do volátil no gás de escape da fermentação, o que pode facilitar a recuperação a jusante do volátil a partir de gases permanentes e outras impurezas. Outra vantagem da produção e recuperação de voláteis em taxas de pulverização de gás reduzidas é que a quantidade de oxigênio presente no gás de escape é reduzida, já que uma maior porcentagem do oxigênio inicial é consumida pelas células no fermentador. Baixas concentrações de oxigênio são vantajosas já que a reação de oxigênio com isopreno para formar polímeros indesejáveis e compostos oxidados é reduzida. Além disso, o uso de taxas de pulverização de gás reduzidas maximiza a quantidade de voláteis no gás de escape, enquanto minimiza gases permanentes, em particular o oxigênio. A maximização da quantidade dos voláteis também é importante na manutenção de condições de operação seguras tendo em vista a natureza extremamente volátil do isopreno e de outros hidrocarbonetos insaturados no processo como dicutido acima.

A remoção contínua de compostos orgânicos voláteis (VOCs) do caldo de fermentação por arraste gasoso é mais eficaz para substâncias cujas propriedades físicas favoreçam a partição na fase gasosa em temperatu-

ras e pressões ambiente. Em geral, um composto pode ser recuperado por arraste gasoso se ele possuir uma alta pressão de vapor em temperaturas de fermentação, combinada com baixa hidrossolubilidade. O coeficiente da lei de Henry também é usado para estimar a eficácia do arraste gasoso na remoção de compostos orgânicos de solução aquosa. Em equilíbrio, a relação entre as concentrações de um composto volátil nas fases líquida e gasosa é dada pela lei de gás de Henry (eq. 1).

$$P = kC \qquad \text{(eq. 1)}$$

onde P é a pressão parcial, C a concentração aquosa e k é o coeficiente da lei de Henry. Sob condições dinâmicas, como no caso de um fermentador gás-pulverizado produzindo um composto orgânico volátil, a concentração de um volátil na fase líquida depende de vários fatores adicionais, resumidos abaixo;

i) Taxa de produção volátil (g/L/h)

ii) Taxa de pulverização de gás (vvm)

iii) Área de superfície da bolha (m^{-2})

iv) Taxa de agitação

Assim, em uma taxa constante de produção volátil, taxas de pulverização de gás maiores tenderão a reduzir a concentração aquosa de estado constante do volátil. A taxa de transferência de massa volátil da fase líquida para a gasosa (ou *vice-versa*) é uma função da diferença entre a concentração volátil aquosa e a concentração esperada no equilíbrio, multiplicada pelo coeficiente de transferência de massa.

$$F = K_L[C - (P/k)] \qquad \text{(eq. 2)}$$

onde F é fluxo (mol s^{-1}), K_L a velocidade de transferência de gás (m s^{-1}), C a concentração volátil aquosa, P é a pressão parcial e k representando o coeficiente da lei de Henry para o volátil. Quando a concentração aquosa é maior que a concentração de equilíbrio, ocorrerá efluxo de gás da fase líquida para a gasosa. A velocidade de transferência de gás, K_L, também será influenciada pela área de superfície gás/líquido, que será alterada como uma função do grau de agitação do caldo de fermentação. Para um fermentador bem agitado, pode-se assumir que a maior parte das fases gasosa e líquida

está em equilíbrio e, assim, a concentração aquosa de um volátil é predominantemente uma função da pressão parcial na fase gasosa acima do líquido, de acordo com a lei de Henry (eq. 1). Deve-se entender que o valor do coeficiente de Henry varia com a temperatura e a composição da fase aquosa do sistema. Assim, a quantidade corrente de isopreno presente no caldo de fermentação aquosa em um determinado momento pode variar da quantidade teórica em um sistema ideal.

Para o isopreno em 298K, o coeficiente de Henry é 0,029 M/atm. Veja Weitz and Loser in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 7th edn., Electronic release, Wiley-VCH Verlag GMBH, Weinheim (2005); veja também Karl *et al.* (2003) *Int. J. Mass Spec.*, *223–224*, 383–395, que são incorporadas como referência em suas totalidades, particularmente com relação aos cálculos do coeficiente da lei de Henry. Portanto, se o gás de escape que sai do fermentador tem uma pressão parcial de isopreno de 0,01 atm (1% v/v) a 0,5 vvm, então a concentração de líquido no estado constante no caldo de fermentação será de 0,29 mM, ou cerca de 20 mg/L. Duplicando o fluxo de ar para 1 vvm reduzirá pela metade a pressão parcial de isopreno acima do fermentador para 0,05% e portanto, a concentração de fase líquida será reduzida para em torno de 10 mg/L.

São aqui fornecidos métodos para produzir isopreno compreendendo: a) a cultura de células sob condições adequadas para a produção de isopreno; e b) a produção de isopreno,em que a concentração da fase líquida de isopreno é menor que cerca de 2 g/L. Em algumas modalidades, a concentração da fase líquida de isopreno na cultura é inferior a cerca de 1 g/L. Em algumas modalidades, a concentração da fase líquida de isopreno na cultura é inferior a cerca de 200 mg/L. Em algumas modalidades, a concentração da fase líquida de isopreno na cultura é inferior a qualquer de cerca de 1,9 g/L, 1,8 g/L, 1,7 g/L, 1,6 g/L, 1,5 g/L, 1,4 g/L, 1,3 g/L, 1,2 g/L, ou 1,1 g/L. Em algumas modalidades, a concentração da fase líquida de isopreno na cultura é inferior a qualquer de cerca de 900 mg/L, 800 mg/L, 700 mg/L, 600 mg/L, 500 mg/L, 400 mg/L, ou 300 mg/L. Em algumas modalidades, a concentração da fase líquida de isopreno na cultura é inferior a qual-

quer de cerca de175 mg/L, 150 mg/L, 125 mg/L, 100 mg/L, 75 mg/L, 50 mg/L, 25 mg/L, 20 mg/L, 15 mg/L, 10 mg/L, 5 mg/L, ou 2,5 mg/L. Em algumas modalidades, a concentração da fase líquida de isopreno na cultura está entre cerca de qualquer dentre 0,1 mg/L e 200 mg/L, 1 mg/L e 200 mg/L, 1 mg/L e 150 mg/L, 1 mg/L e 100 mg/L, 1 mg/L e 50 mg/L, 1 mg/L e 25 mg/L, 1 mg/L e 20 mg/L, ou 10 mg/L e 20 mg/L, 1 mg/L e 1 g/L, 0,1 mg/L e 2 g/L, 1 g/L e 2 g/L, 10 mg/L e 1 g/L, ou 100 mg/L e 1 g/L. Em algumas modalidades, o isopreno produzido é qualquer concentração ou quantidade divulgada na seção intitulada "Produção Exemplar de Isopreno". Em algumas modalidades, a concentração da fase líquida está abaixo do limite de solubilidade de isopreno. Em algumas modalidades, a fase líquida na cultura está saturada com isopreno, e o isopreno está adicionalmente presente em uma segunda fase líquida. Em algumas modalidades, a segunda fase líquida compreende pelo menos cerca de 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, ou 98% de isopreno.

Em algumas modalidades, as células produzem mais que cerca de 400 nmol/g_{wcm}/hora de isopreno. Em algumas modalidades, a quantidade de isopreno está entre cerca de qualquer dentre 400 nmol/g_{wcm}/hora e 1 mol/g_{wcm}/hora, 400 nmol/g_{wcm}/hora e 1 mmol/g_{wcm}/hora, 400 nmol/g_{wcm}/hora e 40 mmol/g_{wcm}/hora, 400 nmol/g_{wcm}/hora e 4 mmol/g_{wcm}/hora, 1 mmol/g_{wcm}/hora e 1,5 mmol/g_{wcm}/hora, 1,5 mmol/g_{wcm}/hora e 3 mmol/g_{wcm}/hora, 3 mmol/g_{wcm}/hora e 5 mmol/g_{wcm}/hora, 5 mmol/g_{wcm}/hora e 25 mmol/g_{wcm}/hora, 25 mmol/g_{wcm}/hora e 100 mmol/g_{wcm}/hora, 100 mmol/g_{wcm}/hora e 500 mmol/g_{wcm}/hora, ou 500 mmol/g_{wcm}/hora e 1000 mmol/g_{wcm}/hora. Em algumas modalidades, a quantidade de isopreno é cerca de qualquer dentre 1 mmol/g_{wcm}/hora, 1,5 mmol/g_{wcm}/hora, 2 mmol/g_{wcm}/hora, 3 mmol/g_{wcm}/hora, 4 mmol/g_{wcm}/hora, ou 5 mmol/g_{wcm}/hora.

O valor baixo para o coeficiente de Henry significa que o isopreno pode ser recuperado do caldo de fermentação por arraste gasoso em baixas taxas de pulverização, por exemplo 0,01 vvm a 2 vvm. Em algumas modalidades, a taxa de pulverização de gás está entre cerca de qualquer dentre 0 vvm e 0,01 vvm, 0,01 vvm e 0,1 vvm, 0,1 vvm e 1 vvm, 0,01 vvm e 0,5 vvm, 0,2 vvm e 1 vvm, ou 0,5 vvm e 1 vvm. Em algumas modalidades, a

taxa de pulverização de gás é cerca de qualquer dentre 0,1 vvm, 0,25 vvm, 0,5 vvm, 0,75 vvm, 1 vvm, 1,25 vvm, 1,5 vvm, 1,75 vvm, ou 2 vvm. Em algumas modalidades, a pulverização de gás não é utilizada. Em algumas modalidades, baixas taxas de pulverização são mantidas em todo o decurso de execução da fermentação, durante a fase de crescimento, ou durante a fase estacionária. Em algumas modalidades, as baixas taxas de pulverização são mantidas entre cerca de qualquer dentre 1 hora e 5 horas, 5 horas e 10 horas, 10 horas e 20 horas, 20 horas e 30 horas, 30 horas e 40 horas, 40 horas e 50 horas, ou 50 horas e 60 horas. O limite inferior da pulverização de gás desejável é definido pelo ponto em que a fase aquosa se torna saturada com isopreno e uma fase orgânica líquida é formada. Isto pode ocorrer apenas abaixo do ponto de ebulição do isopreno (34,1°C a 1 atm), acima do qual uma fase de isopreno líquido nunca se formará. Em temperaturas abaixo do ponto de ebulição do isopreno, a formação de uma fase líquida é determinada pela solubilidade aquosa do isopreno, que é de aproximadamente 650 mg/L a 25°C. Embora seja altamente desejável evitar a formação de uma fase de isopreno líquido, não é absolutamente necessário, contanto que as células possam tolerar a presença de isopreno líquido sem efeitos tóxicos.

Em algumas modalidades, o oxigênio, CO_2, e isopreno são quaisquer das quantidades ou concentrações discutidas na seção intitulada "Produção de Isopreno com Intervalos de Operação Seguros". Em algumas modalidades, o oxigênio é consumido pelas células enquanto mantém metabolismo completamente aeróbico. Em algumas modalidades, um excesso de oxigênio é usado a fim de satisfazer às demandas de oxigênio das células. Intervalos desejáveis de oxigênio no gás de escape são inferiores a 20%, ou inferiores a 15% ou inferiores a 10% (v/v). Níveis de oxigênio abaixo da concentração limite de oxigênio necessários para a combustão do isopreno (9,5% v/v a 1 atm) são particularmente desejáveis. Em algumas modalidades, o ar enriquecido por oxigênio é utilizado com a finalidade de permitir taxas de remoção de gás enquanto satisfaz a demanda de oxigênio celular. Em algumas modalidades, a parte da fase gasosa da remoção de gás com-

preende entre cerca de 0,1% a cerca de 10%, cerca de 10% a cerca de 20%, ou cerca de 20% a cerca de 30% (volume) de oxigênio. Em algumas modalidades, fermentações de isopreno são realizadas sob alta pressão a fim de minimizar a quantidade de oxigênio em excesso necessária para manter os níveis de oxigênio dissolvido necessários na fase líquida.

Em algumas modalidades, a redução da taxa de remoção de gás ao logo do fermentador é vantajosa para um processo de produção de isopreno integrado em que tais condições enriquecem os níveis de isopreno no gás de escape até cerca de 30.000 ug/L (cerca de 1% v/v) sem afetar adversamente a fisiologia das células.

Em algumas modalidades, as taxas de pulverização de gás reduzidas não afetam adversamente significativamente a fisiologia das células. Em algumas modalidades,a taxa de evolução de dióxido de carbono das células em cultura com taxas de pulverização de gás reduzidas está entre cerca de qualquer dentre 1 x 10^{-18}mmol/L/hora a cerca de 1 mol/L/hora, 1 mmol/L/hora a 1 mol/L/hora, 25 mmol/L/hora a 750 mmol/L/hora, 25 mmol/L/hora a 75 mmol/L/hora, 250 mmol/L/hora a 750 mmol/L/hora, ou 450 mmol/L/hora a 550 mmol/L/hora. Em algumas modalidades, a taxa de evolução de dióxido de carbono é de cerca de 50 mmol/L/hora,100 mmol/L/hora, 150 mmol/L/hora, 200 mmol/L/hora, 250 mmol/L/hora, 300 mmol/L/hora, 350 mmol/L/hora, 400 mmol/L/hora, 450 mmol/L/hora, ou cerca de 500 mmol/L/hora. Em algumas modalidades, a viabilidade celular com taxas de pulverização de gás reduzidas é reduzida a menos que cerca de qualquer dentre 1,75 vezes, 1,5 vezes, 1,25 vezes, 1 vez, 0,75 vezes, 0,5 vezes, ou 0,25 vezes. Em algumas modalidades, a viabiliade celular é reduzida a cerca de 2 vezes. Em algumas modalidades, a viabilidade celular com taxas de pulverização de gás reduzidas de uma célula expressando um RNA e/ou proteína da via do MVA e/ou via do DXP de uma ou mais cópias heterólogas e/ou em duplicata de um ácido nucleico da via do MVA e/ou via do DXP é comparada com a de uma célula controle que não possui uma ou mais cópias heterólogas e/ou em duplicata de um ácido nucleico da via do MVA e/ou via do DXP com taxas de pulverização de gás reduzidas. Em algumas moda-

lidades, a viabilidade celular com taxas de pulverização de gás reduzidas de uma célula expressando um RNA e/ou proteína da via do MVA e/ou via do DXP de uma ou mais cópias heterólogas e/ou em duplicata de um ácido nucleico da via do MVA e/ou via do DXP sob o controle de um promotor induzível, em que o promotor está induzido, é comparada com a de uma célula controle contendo uma ou mais cópias heterólogas e/ou em duplicata de um ácido nucleico da via do MVA e/ou via do DXP sob o controle de um promotor induzível, em que o promotor não está induzido (não induzido) com taxas de pulverização de gás reduzidas. Em algumas modalidades, o promotor induzível é um promotor de beta-galactosidase.

Em algumas modalidades, a fermentação de um organismo hospedeiro geneticamente modificado que converte pelo menos 5% do carbono total consumido pelo organismo em um hidrocarboneto volátil, insaturado. Em algumas modalidades, a produção de um hidrocarboneto insaturado nessa taxa como para estar presente no gás de escape da fermentação em um nível de pelo menos cerca de 100 ug/L, 500 ug/L, 1000 ug/L, 2. 500 ug/L, 5.000 ug/L, 7.500 ug/L, ou 10.000 ug/L.

Em algumas modalidades, o hidrocarboneto insaturado é recuperado do fluxo de gás de escape de forma a estar adequado a altas taxas de produção, que correspondem à concentração no gás de escape de pelo menos cerca de qualquer dentre100 ug/L, 500 ug/L, 1000 ug/L, 2. 500 ug/L, 5.000 ug/L, 7.500 ug/L, ou 10.000 ug/L. Em algumas modalidades, a extração e recuperação contínuas de um hidrocarboneto insaturado a partir do gás de escape da fermentação em particular em baixas taxas de remoção de gás tal que o gás de escape resultante é enriquecido com o componente volátil de interesse. Em algumas modalidades, a recuperação do hidrocarboneto volátil por métodos que dependem de concentrações elevadas do volátil. Por exemplo, a captura eficiente do isopreno no gás de escape da fermentação através do uso de tecnologias de compressão/condensação ou destilação extrativa. Também é contemplado o uso de cartuchos de carbono ativado além de adsorventes de sílica-gel, dessorção e concentração de isopreno a partir de cartuchos de carbono e/ou construção e fermentação de

organismos hospedeiros como cepas de *E. coli* que podem converter cerca de 5% ou mais do substrato de glicose em isopreno e resulta em concentrações de gás de escape maiores que cerca de 15.000 ug/L de isopreno. Métodos de recuperação incluem quaisquer dos métodos descritos aqui.

Também são aqui fornecidos métodos para produzir um composto, em que o composto tem uma ou mais características selecionadas do grupo que consiste em (a) um coeficiente da lei de Henry inferior a cerca de 250M/atm e (b) uma solubilidade em água de menos de cerca de 100 g/L. Em algumas modalidades, o método compreende: a) a cultura de células sob condições adequadas para a produção do composto, em que é adicionado gás (como a adição de gás a um sistema como um sistema de fermentação) em uma taxa de pulverização gasosa entre cerca de 0,01 vvm e cerca de 2 vvm; e b) a produção do composto. Em uma modalidade, a taxa de pulverização gasosa é 0 vvm. Em outra modalidade, a taxa de pulverização gasosa é 0 vvm – 0,01 vvm.

Em algumas modalidades, a quantidade do composto que se divide na massa celular não está incluída nos valores de solubilidade da fase líquida. Em algumas modalidades, a concentração da fase líquida está abaixo da solubilidade limite do composto.

Em algumas modalidades, os compostos podem ser continuamente recuperados do caldo de fermentação por arraste gasoso em taxas de pulverização de gás baixas, em particular aqueles compostos com coeficientes da lei de Henry de cerca de qualquer inferior a 250 M/atm, 200 M/atm, 150 M/atm, 100 M/atm, 75 M/atm, 50 M/atm, 25 M/atm, 10 M/atm, 5 M/atm, ou 1 M/atm. Exemplos incluem aldeídos tais como acetaldeído a 15 M/atm), cetonas como acetona (30 M/atm), metil etil cetona (100 M/atm), ou 2-butanona (20 M/atm), ou alcoóis incluindo metanol (220 M/atm), etanol (200 M/atm), 1-butanol (120 m/atm) ou alcoóis C5 incluindo 3-metil-3-buten-1-ol, e 3-metil-2-buten-1-ol (50-100 M/atm). Ésteres de alcoóis geralmente têm constantes de Henry menores que os respectivos alcoóis, por exemplo, acetato de etila (6-9 M/atm) ou os acetil ésteres de alcoóis C5 (<5 M/atm). Compostos com coeficientes da lei de Henry inferiores a 1M/atm são particular-

mente desejáveis. Exemplos incluem hemiterpenos, monoterpenos ou sesquiterpenos, além de outros hidrocarbonetos como hidrocarbonetos C1 a C5 (por exemplo, metano, etano, etileno ou propileno). Em algumas modalidades, os hidrocarbonetos como hidrocarbonetos C1 a C5 são saturados, insaturados ou ramificados. Em algumas modalidades, o hidrocarboneto C1 a C5 é um hidrocarboneto alifático insaturado (por exemplo, etileno, propileno, butileno ou isobutileno). Em algumas modalidades, o hidrocarboneto C1 a C5 é uma oleofina.

Em geral, há uma correlação entre o coeficiente da lei de Henry e hidrossolubilidade em que compostos com coeficientes muito baixos são escassamente solúveis em água (consideravelmente insolúveis em água). Embora voláteis com solubilidades infinitas em água (por exemplo, acetona ou etanol) possam ser removidos por arraste gasoso, limites de solubilidade desejáveis são inferiores a cerca de qualquer dentre 100 g/L, 75 g/L, 50 g/L, 25 g/L, 10 g/L, 5 g/L, ou 1g/L.

Em algumas modalidades de quaisquer dos métodos para produzir quaisquer dos compostos aqui descritos, a taxa de pulverização de gás está entre cerca de qualquer dentre 0 vvm e 0,01 vvm, 0,01 vvm e 0,1 vvm, 0,1 vvm e 1 vvm, 0,2 vvm e 1 vvm, ou 0,5 vvm e 1 vvm. Em algumas modalidades, a taxa de pulverização de gás é cerca de qualquer dentre 0,1 vvm, 0,25 vvm, 0,5 vvm, 0,75 vvm, 1 vvm, 1,25 vvm, 1,5 vvm, 1,75 vvm, ou 2 vvm. Em algumas modalidades, as baixas taxas de pulverização são mantidas em todo o decurso de execução da fermentação, durante a fase de crescimento, ou durante a fase estacionária. Em algumas modalidades, as baixas taxas de pulverização são mantidas entre cerca de qualquer dentre 1 hora e 5 horas, 5 horas e 10 horas, 10 horas e 20 horas, 20 horas e 30 horas, 30 horas e 40 horas, 40 horas e 50 horas, ou 50 horas e 60 horas.

Quaisquer dos sistemas descritos aqui podem ser usados nos métodos para produzir um composto aqui descrito. O método padrão poderia ser usado para purificar tal como aqueles descritos na seção intitulada "Exemplos de Métodos de Purificação" Separados podem ser realizados após a recuperação, por exemplo, por técnicas de destilação ou adsorção

seletiva.

Produção Exemplar de Isopreno

Em algumas modalidades, as células são cultivadas em meio de cultura sob condições que permitem a produção de isopreno pelas células. Por "produtividade absoluta de pico" quer-se dizer a quantidade máxima absoluta de isopreno no gás de escape (*off-gas*) durante a cultura das células por um determinado período de tempo (por exemplo, a cultura de células durante uma execução de fermentação particular). Por "ponto de tempo de produtividade absoluta de pico" quer-se dizer o ponto de tempo durante uma execução de fermentação quando a quantidade absoluta do isopreno no gás de escape é máxima durante a cultura das células por um determinado período de tempo (por exemplo, a cultura de células durante uma execução de fermentação particular). Em algumas modalidades, a quantidade de isopreno é medida no ponto de tempo de produtividade absoluta de pico. Em algumas modalidades, a produtividade absoluta de pico para as células é sobre qualquer uma das quantidades de isopreno divulgadas aqui.

Por "produtividade específica de pico" quer-se dizer a quantidade máxima de isopreno produzida por células durante a cultura das células por um determinado período de tempo (por exemplo, a cultura de células durante uma execução de fermentação particular). Por "ponto de tempo de produtividade específica de pico" quer-se dizer o ponto de tempo durante a cultura das células por um período de tempo particular (por exemplo, a cultura de células durante uma execução de fermentação particular), quando a quantidade de isopreno produzida por célula está em um máximo. A produtividade específica é determinada pela divisão da produtividade total pela quantidade de células, como determinado pela densidade ótica em 600nm (OD600). Em algumas modalidades, a quantidade de isopreno é medida no ponto de tempo de produtividade específica de pico. Em algumas modalidades, a produtividade específica de pico para as células é sobre qualquer uma das quantidades de isopreno por células divulgadas aqui.

Por "concentração de pico" quer-se dizer a quantidade máxima

de isopreno produzida durante a cultura das células por um determinado período de tempo (por exemplo, a cultura de células durante uma execução de fermentação particular). Por "ponto de tempo de concentração de pico" quer-se dizer o ponto de tempo durante a cultura das células por um período de tempo particular (por exemplo, a cultura de células durante uma execução de fermentação particular), quando a quantidade de isopreno produzido por célula está em um máximo. Em algumas modalidades, a quantidade de isopreno é medida no ponto de tempo de concentração de pico. Em algumas modalidades, a concentração de pico para as células é sobre qualquer uma das quantidades de isopreno divulgadas aqui.

Por "produtividade cumulativa total" quer-se dizer a quantidade total, cumulativa de isopreno produzida durante a cultura das células por um período de tempo particular (por exemplo, a cultura de células durante uma execução de fermentação particular). Em algumas modalidades, a quantidade total, cumulativa de isopreno é medida. Em algumas modalidades, a produtividade total cumulativa nas células é sobre qualquer uma das quantidades de isopreno divulgadas aqui.

Por "resposta relativa do detector" quer-se dizer a razão entre a resposta do detector (como a área de GC/MS) para um composto (tal como isopreno) e a resposta do detector (tal como a área de GC/MS) de um ou mais compostos (como todos os hidrocarbonetos C5). A resposta do detector pode ser medida como descrito aqui, como pela análise de GC/MS realizada com o sistema Agilent 6890 GC/MS equipado com uma coluna Agilent HP-5MS GC/MS (30 m x 250 µm; 0,25 µm de espessura de filme). Se desejado, a resposta relativa do detector pode ser convertida para uma percentagem de peso usando fatores de resposta para cada um dos compostos. Este fator de resposta é uma medida da quantidade de sinal que é gerado para um composto especial (ou seja, a sensibilidade do detector é para um composto particular). Este fator de resposta pode ser usado como um fator de correção para converter a resposta do detector para uma percentagem de peso quando o detector tem sensibilidades diferentes para os compostos que estão sendo comparados. Alternativamente, a percentagem de peso

pode ser aproximada ao assumir que os fatores de resposta são os mesmos para os compostos que estão sendo comparados. Assim, a percentagem de peso pode ser considerada como sendo aproximadamente a mesma que a da resposta relativa do detector.

Em algumas modalidades, as células em cultura produzem isopreno em quantidades maiores que, ou de cerca de 1, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000, 1.250, 1.500, 1.750, 2.000, 2.500, 3.000, 4.000, 5.000, ou mais nmol do isopreno/grama de células para o peso úmido das células/hora (nmol/gwcm/h). Em algumas modalidades, a quantidade de isopreno está entre cerca de 2 a cerca de 5.000 nmol/gwcm/h, tal como entre cerca de 2 a cerca de 100 nmol/gwcm/h, cerca de 100 a cerca de 500 nmol/gwcm/h, cerca de 150 a cerca de 500 nmol/gwcm/h, cerca de 500 a cerca de 1.000 nmol/gwcm/h, cerca de 1.000 a cerca de 2.000 nmol/gwcm/h, ou cerca de 2.000 a cerca de 5.000 nmol/gwcm/h. Em algumas modalidades, a quantidade de isopreno está entre cerca de 20 a cerca de 5.000 nmol/gwcm/h, cerca de 100 a cerca de 5.000 nmol/gwcm/h, cerca de 200 a cerca de 2.000 nmol/gwcm/h, cerca de 200 a cerca de 1.000 nmol/gwcm/h, cerca de 300 a cerca de 1.000 nmol/gwcm/h, ou cerca de 400 a cerca de 1.000 nmol/gwcm/h.

A quantidade de unidades de isopreno em nmol/gwcm/h pode ser medida conforme divulgado na Patente US No. 5.849.970, que é incorporada aqui por referência na sua totalidade, particularmente no que diz respeito à medição da produção de isopreno. Por exemplo, dois mL de *headspace* (por exemplo, "*headspace*" de uma cultura como a 2 mL da cultura cultivadas em frascos fechados a 32°C com agitação de 200 rpm, por aproximadamente 3 horas) são analisados para isopreno usando um sistema de cromatografia gasosa padrão, tais como um sistema operado isotermicamente (85°C) com uma coluna n-octano/porasil C (Alltech Associates, Inc., Deerfield, Illinois) e acoplados a um detector de gás de redução de óxido de mercúrio RGD2 (Trace Analytical, Menlo Park, CA) (ver, por exemplo, Greenberg *et al.*, Atmos. Environ. 27A: 2689-2692, 1993; Silver *et al.*, Plant Physiol 97:1588-1591 de 1991, sendo cada um deles aqui incorporado por referên-

cia em sua totalidade, em particular, com relação à medição da produção de isopreno). As unidades de área de cromatografia gasosa são convertidas em nmol de isopreno por meio de uma curva de calibração de concentração padrão de isopreno. Em algumas modalidades, o valor para gramas de células por peso úmido das células é calculado pela obtenção do valor de A_{600} para uma amostra da cultura de células e, em seguida, o valor A_{600} é convertido para gramas de células com base em uma curva de calibração de peso úmido para as culturas de células com um valor A_{600} conhecido. Em algumas modalidades, os gramas de células são estimados assumindo-se que um litro de caldo (incluindo o meio celular e células) com um valor de A_{600} de 1 tem um peso úmido de célula de 1 grama. O valor também é dividido pelo número de horas que a cultura foi incubada, tal como três horas.

Em algumas modalidades, as células em cultura produzem isopreno em quantidades maiores que, ou de cerca de 1, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000, 1.250, 1.500, 1.750, 2.000, 2.500, 3.000, 4.000, 5.000, 10.000, 100.000, ou mais de ng de isopreno/g de células para o peso úmido das células/h (nmol/gwcm/h). Em algumas modalidades, a quantidade de isopreno está entre cerca de 2 a cerca de 5.000 nmol/gwcm/h, tal como entre cerca de 2 a cerca de 100 nmol/gwcm/h, cerca de 100 a cerca de 500 nmol/gwcm/h, cerca de 500 a cerca de 1.000 nmol/gwcm/h, cerca de 1.000 a cerca de 2.000 nmol/gwcm/h, ou cerca de 2.000 a cerca de 5.000 nmol/gwcm/h. Em algumas modalidades, a quantidade de isopreno está entre cerca de 20 a cerca de 5.000 nmol/gwcm/h, cerca de 100 a cerca de 5.000 nmol/gwcm/h, cerca de 200 a cerca de 2.000 nmol/gwcm/h, cerca de 200 a cerca de 1.000 nmol/gwcm/h, cerca de 300 a cerca de 1.000 nmol/gwcm/h, ou cerca de 400 a cerca de 1.000 nmol/gwcm/h. A quantidade de isopreno em nmol/gwcm/h pode ser calculada pela multiplicação do valor pela produção de isopreno nas unidades de nmol/gwcm/h discutidas acima de 68,1 (como descrito na Equação 5 abaixo).

Em algumas modalidades, as células em cultura produzem uma titulação cumulativa (total) de isopreno maior que, ou cerca de, 1, 10, 25, 50,

100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000, 1.250, 1.500, 1.750, 2.000, 2.500, 3.000, 4.000, 5.000, 10.000, 50.000, 100.000, ou mais de MG de isopreno/L de caldo (mg/Lcaldo, em que o volume de caldo inclui o volume das células e do meio celular). Em algumas modalidades, a quantidade de isopreno está entre cerca de 2 a cerca de 5.000 mg/Lcaldo, tal como entre cerca de 2 a cerca de 100 mg/Lcaldo, cerca de 100 a cerca de 500 mg/Lcaldo, cerca de 500 a cerca de 1.000 mg/Lcaldo, cerca de 1000 a cerca de 2.000 mg/Lcaldo, ou cerca de 2.000 a cerca de 5.000 mg/Lcaldo. Em algumas modalidades, a quantidade de isopreno está entre cerca de 20 a cerca de 5.000 mg/Lcaldo, cerca de 100 a cerca de 5.000 mg/Lcaldo, cerca de 200 a cerca de 2.000 mg/Lcaldo, cerca de 200 a cerca de 1.000 mg/Lcaldo, cerca de 300 a cerca de 1.000 mg/Lcaldo, ou cerca de 400 a cerca de 1.000 mg/Lcaldo.

A produtividade específica de isopreno em mg de isopreno/L de *headspace* do frasco agitado ou culturas semelhantes pode ser medida tomando uma amostra de 1 ml da cultura de células em um valor de OD_{600} de aproximadamente 1,0, colocando-a em um frasco de 20 ml, incubando por 30 minutos e, em seguida medindo a quantidade de isopreno no *headspace* (como descrito, por exemplo, no exemplo 1, parte II). Se o valor da OD_{600} não for 1,0, então a medida pode ser normalizada para um valor de OD600 1,0 pela divisão do valor da OD_{600}. O valor do mg de isopreno/L de "*headspace*" pode ser convertido para mg/Lcaldo/h/OD_{600} de cultura de caldo pela multiplicação por um fator de 38. O valor em unidades de mg/Lcaldo/h/OD_{600} pode ser multiplicado pelo número de horas e o valor de OD600 para obter a titulação cumulativa em unidades de mg de isopreno/L de caldo.

A taxa de produção de isopreno instantânea em mg/L_{caldo}/h em um fermentador pode ser medida tomando uma amostra do fermentador de gases de exaustão, analisando a mesma para a quantidade de isopreno (em unidades tais como mg de isopreno por L_{gas}), como descrito, por exemplo, no exemplo 1, parte II e multiplicando este valor pela taxa que o gás de escape é passado para cada litro de caldo (por exemplo, em 1 vvm (volume de ar/volume de caldo/minuto), isto é, de 60 L_{gas} por hora). Assim, um nível de

gases de gás de escape de 1 mg/Lgas corresponde a uma taxa de produção instantânea de 60 mg/Lcaldo/h em fluxo de ar de 1 vvm. Se desejar, o valor das unidades de mg/L_{caldo}/h pode ser dividido pelo valor OD_{600} para obter a taxa específica em unidades de mg/L_{caldo}/h/OD. O valor médio de mg de isopreno/Lgás pode ser convertido para a produtividade total do produto (gramas de isopreno por litro de caldo de fermentação, mg/Lcaldo) pela multiplicação desta concentração média de isopreno do gás de escape pela quantidade total de gás de escape injetado por litro de caldo de fermentação durante a fermentação. Assim, uma concentração média de isopreno de gás de escape de 0,5 mg/L_{caldo}/h durante 10 horas a 1 vvm corresponde a uma concentração total do produto de 300 mg de isopreno L_{caldo}.

Em algumas modalidades, as células em cultura convertem mais que, ou cerca de, 0,0015, 0,002, 0,005, 0,01, 0,02, 0,05, 0,1, 0,12, 0,14, 0,16, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,2, 1,4, 1,6, 1,8, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0 ou 8,0% de carbono no meio de cultura de células em isopreno. Em algumas modalidades, a conversão percentual de carbono em isopreno está entre cerca de 0,002 a cerca de 4,0%, cerca de 0,002 a cerca de 3,0%, cerca de 0,002 a cerca de 2,0%, cerca de 0,002 a cerca de 1,6%, cerca de 0,002 a cerca de 0,005%, cerca de 0,005 a cerca de 0,01%, cerca de 0,01 a cerca de 0,05%, cerca de 0,05 a cerca de 0,15%, 0,15 a cerca de 0,2%, cerca de 0,2 a cerca de 0,3%, cerca de 0,3 a cerca de 0,5%, cerca de 0,5 a cerca de 0,8%, cerca de 0,8 a cerca de 1,0%, ou cerca de 1,0 a cerca de 1,6%. Em algumas modalidades, a conversão percentual de carbono em isopreno está entre cerca de 0,002 a cerca de 0,4%, de 0,002 a cerca de 0,16%, 0,04 a cerca de 0,16%, cerca de 0,005 a cerca de 0,3%, cerca de 0,01 a cerca de 0,3%, ou cerca de 0,05 a cerca de 0,3%.

A conversão percentual de carbono em isopreno (também referida como "% do rendimento do carbono") pode ser medida pela divisão dos mols de carbono no isopreno produzidos por mols de carbono na fonte de carbono (tal como os mols de carbono no lote e glicose alimentada e extrato de levedura). Este número é multiplicado por 100% para dar um valor percentual (conforme indicado na Equação 1).

Equação 1

% de rendimento de carbono = (mols de carbono no isopreno produzido)/(mols de carbono na fonte de carbono) * 100

Para este cálculo, pode-se assumir que o extrato de levedura contém 50% p/p de carbono. Como um exemplo, para os 500 litros descritos no Exemplo 7, parte VIII, a conversão percentual de carbono em isopreno pode ser calculada como mostrado na Equação 2.

Equação 2

% de rendimento de carbono = (39,1 g de isopreno * 1/68,1mol/g * 5C/mol)/[(181.221 g de glicose * 1/180 mol/g * 6C/mol) + (17.780 g de extrato de levedura * 0,5/12 mol/g)] * 100 = 0,042%

Para as duas fermentações de 500 litros descritas aqui (Exemplo 7, partes VII e VIII), a conversão percentual de carbono em isopreno está entre 0,04-0,06%. Um rendimento de 0,11-0,16% de carbono foi alcançado usando sistemas de 14 litros, conforme descrito neste documento. O exemplo 11, parte V descreve a conversão de 1,53% de carbono para isopreno usando os métodos descritos neste documento.

Um técnico no assunto pode facilmente converter a taxa de produção de isopreno ou a quantidade de isopreno produzido em outras unidades. As equações exemplares estão listadas abaixo para a interconversão entre as unidades.

Unidades para a Taxa de produção de isopreno (total e específica)

Equação 3

1 g de isopreno/L_{caldo}/h = 14,7 isopreno mmol de isopreno/L_{caldo}/h (taxa volumétrica total)

Equação 4

1 nmol de isopreno/gwcm/h = 1 nmol de isopreno/L_{caldo}/h/OD_{600} (Esta conversão pressupõe que um litro de caldo com um valor de OD600 de 1 tem um peso úmido de célula de 1 grama).

Equação 5

1 nmol de isopreno/gwcm/h = 68,1 ng de isopreno/gwcm/h (dado o peso molecular de isopreno)

Equação 6

1 nmol de isopreno /$L_{gás}$ O_2/h = 90 nmol de isopreno/L_{caldo}/h (a uma taxa de fluxo de O_2 de 90 L/h por L de caldo de cultura)

Equação 7

1 ug de isopreno/$L_{gás}$ de isopreno em gás de escape = 60 ug de isopreno/L_{caldo}/h, com uma taxa de fluxo de 60 L_{gas} por L_{caldo} (1 vvm)

Unidades para titulação (total e específica)

Equação 8

1 nmol de isopreno/mg de proteína celular = 150 nmol de isopreno/L_{caldo}/OD_{600} (Esta conversão pressupõe que um litro de caldo com um valor de OD_{600} de 1 tem uma proteína celular total de aproximadamente 150 mg) (produtividade específica)

Equação 9

1 g de isopreno/L_{caldo} = 14,7 mmol de isopreno/L_{caldo} (titulação total)

Se desejado, a Equação 10 pode ser usada para converter qualquer uma das unidades que incluem o peso úmido das células para as unidades correspondentes, que incluem o peso seco das células.

Equação 10

Peso seco de células = (peso úmido das células)/3,3

Se desejado, a Equação 11 pode ser usada para conversão entre unidades de ppm e ug/L. Em particular, "ppm" significa partes por milhão definido em termos de ug/g (p/p). As concentrações de gases também podem ser expressas em uma base volumétrica usando "ppmv" (partes por milhão por volume), definida em termos de uL/L (v/v). A conversão de ug/L para ppm (por exemplo, ug de analito por g de gás) pode ser realizada pela determinação da massa por L de gás de escape (ou seja, a densidade do gás). Por exemplo, um litro de ar em condições normais de temperatura e pressão (CNTP; 101,3 kPa (1 bar) e 0°C (273,15K)) tem uma densidade de aproximadamente 1,29 g/L. Assim, uma concentração de 1 ppm (ug/g) é igual a 1,29 ug/L na CNTP (equação 11). A conversão de ppm (ug/g) ug/L é uma função tanto da pressão, temperatura como da composição global do

gás de escape.

Equação 11

1 ppm (ug/g) é igual a 1,29 ug/L em condições normais de temperatura e pressão (CNTP; 101,3 kPa (1 bar) e 0°C (273,15K)).

A conversão de ug/L para ppmv (por exemplo, um uL do analito por L de gás) pode ser realizada usando a Lei do Gás Universal (equação 12). Por exemplo, uma concentração de gás de escape de 1000 ug/Lgás corresponde a 14,7 umol/Lgás. A constante universal dos gases é 0,082057 L.atm K-1mol-1, então usando a equação 12, o volume ocupado por 14,7 umol de HG na CNTP é igual a 0,329 mL. Portanto, a concentração de 1000 ug/L de HG é igual a 329 ppmv ou 0,0329% (v/v) na CNTP.

Equação 12

PV = nRT, em que "P" é a pressão, "V" é o volume, "n" mols de gás, "R" é a constante universal dos gases e "T" é a temperatura em Kelvin.

A quantidade de impurezas em composições de isopreno é normalmente medida aqui em peso por volume (p/v) com base em unidades como ug/L. Se desejado, as medidas em unidades de ug/L podem ser convertidas em unidades de mg/m^3 através da equação 13.

Equação 13

1 ug/L = 1 mg/m^3

Em algumas modalidades abrangidas pela invenção, uma célula que compreende um ácido nucleico heterólogo que codifica um polipeptídeo de isopreno sintase produz uma quantidade de isopreno que é de pelo menos ou cerca de, 2 vezes, 3 vezes, 5 vezes, 10 vezes, 25 vezes, 50 vezes, 100 vezes, 150 vezes, 200 vezes, 400 vezes, ou maior que a quantidade de isopreno produzido a partir de uma célula correspondente crescida essencialmente sob as mesmas condições, sem o ácido nucleico heterólogo que codifica o polipeptídeo do isopreno sintase.

Em algumas modalidades abrangidas pela invenção, uma célula que compreende um ácido nucleico heterólogo que codifica um polipeptídeo de isopreno sintase e um ou mais ácidos nucleicos heterólogos que codificam um polipeptídeo de DXS, IDI, e/ou via do MVA produzem uma quanti-

dade de isopreno que é pelo menos, ou cerca de 2 vezes, 3 vezes, 5 vezes, 10 vezes, 25 vezes, 50 vezes, 100 vezes, 150 vezes, 200 vezes, 400 vezes, ou maior que a quantidade de isopreno produzido a partir de uma célula cultivada correspondente sob as mesmas condições, sem os ácidos nucleicos heterólogos.

Em algumas modalidades, a composição de isopreno compreende mais que, ou cerca de, 99,90, 99,92, 99,94, 99,96, 99,98, ou 100% de isopreno, em peso, em comparação com o peso total de todos os hidrocarbonetos C5 na composição. Em algumas modalidades, a composição tem uma resposta relativa de detector maior que, ou de cerca de, 99,90, 99,91, 99,92, 99,93, 99,94, 99,95, 99,96, 99,97, 99,98, 99,99, ou 100% de isopreno em comparação com a resposta do detector para todos os hidrocarbonetos C5 na composição. Em algumas modalidades, a composição de isopreno compreende entre cerca de 99,90 a cerca de 99,92, cerca de 99,92 a cerca de 99,94, cerca de 99,94 a cerca de 99,96, cerca de 99,96 a cerca de 99,98, cerca de 99,98 a 100% de isopreno em peso em comparação com o peso total de todos os hidrocarbonetos C5 na composição.

Em algumas modalidades, a composição de isopreno compreende menos que, ou cerca de, 0,12, 0,10, 0,08, 0,06, 0,04, 0,02, 0,01, 0,005, 0,001, 0,0005, 0,0001, 0,00005, ou 0,00001% de hidrocarbonetos C5 além de isopreno (tal como 1,3-ciclopentadieno, *trans*-1,3-pentadieno, *cis*-1,3-pentadieno, 1,4-pentadieno, 1-pentino, 2-pentino, 3-metil-1-butino, pent-4-eno-1-ino, *trans*-pent-3-eno-1-ino, *cis*-pent-3-eno-1-ino, 3-hexen-1-ol, acetato de 3-hexen-1-ila, limoneno, geraniol (trans-3,7-dimetil-2,6-octadien-1-ol) e citronelol (3,7-dimetil-6-octen-1-ol)), em peso, em relação ao peso total de todos os hidrocarbonetos C5 na composição. Em algumas modalidades, a composição tem uma resposta do detector de menos que, ou cerca de, 0,12, 0,10, 0,08, 0,06, 0,04, 0,02, 0,01, 0,005, 0,001, 0,0005, 0,0001, 0,00005, ou 0,00001% de hidrocarbonetos C5 além de isopreno em comparação com a resposta do detector para todos os hidrocarbonetos C5 na composição. Em algumas modalidades, a composição tem uma resposta relativa do detector de menos que, ou cerca de, 0,12, 0,10, 0,08, 0,06, 0,04, 0,02, 0,01, 0,005,

0,001, 0,0005, 0,0001, 0,00005, ou 0,00001% para 1,3-ciclopentadieno, trans-1,3-pentadieno, cis-1,3-pentadieno, 1,4-pentadieno, 1-pentino, 2-pentino, 3-metil-1-butino, pent-4-eno-1-ino, *trans*-pent-3-eno-1-ino, *cis*-pent-3-eno-1-ino, 3-hexen-1-ol, acetato de 3-hexen-1-ila, limoneno, geraniol (trans-3,7-dimetil-2,6-octadien-1-ol) e citronelol (3,7-dimetil-6-octen-1-ol) em comparação com a resposta do detector para todos os hidrocarbonetos C5 na composição. Em algumas modalidades, a composição de isopreno compreende entre cerca de 0,02 a 0,04%, cerca de 0,04 a cerca de 0,06%, cerca de 0,06 a 0,08%, cerca de 0,08 a 0,10%, ou cerca de 0,10 a cerca de 0,12% de hidrocarbonetos C5 diferentes de isopreno (tal como, 1,3-ciclopentadieno, trans-1,3-pentadieno, cis-1,3-pentadieno, 1,4-pentadieno, 1-pentino, 2-pentino, 3-metil-1-butino, pent-4-eno-1-ino, *trans*-pent-3-eno-1-ino, *cis*-pent-3-eno-1-ino, 3-hexen-1-ol, acetato de 3-hexen-1-ila, limoneno, geraniol (trans-3,7-dimetil-2,6-octadien-1-ol) e citronelol (3,7-dimetil-6-octen-1-ol), em peso, em comparação com o peso total de todos os hidrocarbonetos C5 na composição.

Em algumas modalidades, a composição de isopreno compreende menos ou cerca de 50, 40, 30, 20, 10, 5, 1, 0,5, 0,1, 0,05, 0,01, ou 0,005 ug/L de um composto que inibe a polimerização de isopreno para qualquer composto na composição que iniba a polimerização de isopreno . Em algumas modalidades, a composição de isopreno compreende entre cerca de 0,005 a cerca de 50, tal como cerca de 0,01 a cerca de 10, cerca de 0,01 a cerca de 5, cerca de 0,01 a cerca de 1, cerca de 0,01 a cerca de 0,5, ou cerca de 0,01 a cerca de 0,005 ug/L de um composto que inibe a polimerização de isopreno para qualquer composto na composição que iniba a polimerização de isopreno. Em algumas modalidades, a composição de isopreno compreende menos ou cerca de 50, 40, 30, 20, 10, 5, 1, 0,5, 0,1, 0,05, 0,01, ou 0,005 ug/L de um hidrocarboneto diferente de isopreno (como 1,3-ciclopentadieno, *trans*-1,3-pentadieno, *cis*-1,3-pentadieno, 1,4-pentadieno, 1-pentino, 2-pentino, 3-metil-1-butino, pent-4-eno-1-ino, *trans*-pent-3-eno-1-ino, *cis*-pent-3-eno-1-ino, 3-hexen-1-ol, acetato de 3-hexen-1-ila, limoneno, geraniol (trans-3,7-dimetil-2,6-octadien-1-ol) e citronelol (3,7-dimetil-6-octen-1-ol).

Em algumas modalidades, a composição de isopreno compreende entre cerca de 0,005 a cerca de 50, como cerca de 0,01 a cerca de 10, cerca de 0,01 a cerca de 5, cerca de 0,01 a cerca de 1, cerca de 0,01 a cerca de 0,5, ou cerca de 0,01 a cerca de 0,005 ug/L de um hidrocarboneto diferente de isopreno. Em algumas modalidades, a composição de isopreno compreende menos ou cerca de 50, 40, 30, 20, 10, 5, 1, 0,5, 0,1, 0,05, 0,01, ou 0,005 ug/L de uma proteína ou ácido graxo (estando essa proteína ou ácido graxo naturalmente associado com borracha natural).

Em algumas modalidades, a composição de isopreno compreende menos ou cerca de 10, 5, 1, 0,8, 0,5, 0,1, 0,05, 0,01, ou 0,005 ppm de alfa acetilenos, piperilenos, acetonitrilo, ou 1,3-ciclopentadieno. Em algumas modalidades, a composição de isopreno compreende menos ou cerca de 5, 1, 0,5, 0,1, 0,05, 0,01, ou 0,005 ppm de enxofre ou alenos. Em algumas modalidades, a composição de isopreno compreende menos ou cerca de 30, 20, 15, 10, 5, 1, 0,5, 0,1, 0,05, 0,01, ou 0,005 ppm de todos acetilenos (tais como pentino-1, butino-2, 2MB1-3ino, e 1-pentino-4ino). Em algumas modalidades, a composição de isopreno compreende menos ou cerca de 2000, 1000, 500, 200, 100, 50, 40, 30, 20, 10, 5, 1, 0,5, 0,1, 0,05, 0,01, ou 0,005 ppm de dímeros de isopreno, tais como dímeros cíclicos do isopreno (por exemplo, compostos derivados C10 cíclicos da dimerização de duas unidades de isopreno).

Em algumas modalidades, a composição de isopreno inclui etanol, acetona, um álcool de prenila C5 (tal como 3-metil-3-buten-1-ol ou 3-metil-2-buten-1-ol), ou por dois ou mais dos elementos anteriores. Em modalidades específicas, a composição de isopreno compreende maior que ou cerca de 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100, ou 120 ug/L de etanol, acetona, a C5 álcool de prenila (tal como 3-metil-3-buten-1-ol ou 3-metil-2-buten-1-ol), ou por dois ou mais dos elementos anteriores. Em algumas modalidades, a composição de isopreno compreende entre cerca de 0.005 a cerca de 120, tal como cerca de 0.01 a cerca de 80, cerca de 0.01 a cerca de 60, cerca de 0.01 a cerca de 40, cerca de 0.01 a cerca de 30, cerca de 0.01 a cerca de 20, cerca de 0.01 a cerca de 10, cerca de 0.1 a

cerca de 80, cerca de 0.1 a cerca de 60, cerca de 0.1 a cerca de 40, cerca de 5 a cerca de 80, cerca de 5 a cerca de 60, ou cerca de 5 a cerca de 40 ug/L de etanol, acetona, a C5 álcool de prenila, ou por dois ou mais dos elementos anteriores.

Em algumas modalidades, a composição de isopreno inclui um ou mais dos seguintes componentes: 2-heptanona, 6-metil-5-hepten-2-ona, 2,4,5-trimetilpiridina, 2,3,5-trimetilpirazina, citronelal, acetaldeído, metanotiol, acetato de metila, 1-propanol, diacetila, 2-butanona, 2-metil-3-buten-2-ol, acetato de etila, 2-metil-1-propanol, 3-metil-1-butanal, 3-metil-2-butanona, 1-butanol, 2-pentanona, 3-metil-1-butanol, isobutirato de etila, 3-metil-2-butenal, acetato de butila, acetato de 3-metilbutila, acetato de 3-metil-3-buten-1-ila, acetato de 3-metil-2-buten-1-ila, (E)-3,7-dimetil-1,3,6-octatrieno, (Z)-3,7-dimetil-1,3,6-octatrieno, 2,3-cicloheptenolpiridina, ou um polímero isopreno linear (tal como um dímero isopreno linear ou um trímero de isopreno linear derivado da polimerização de múltiplas unidades de isopreno). Em diversas modalidades, a quantidade de um destes componentes relativo à quantidade de isopreno em unidades de porcentagem por peso (ou seja, peso dos componentes dividido pelo peso do isopreno multiplicado por 100) é maior do que ou cerca de 0,01, 0,02, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, ou 110% (p/p). Em algumas modalidades, a resposta do detector relativo ao segundo composto em comparação com a resposta do detector de isopreno é maior do que ou cerca de 0,01, 0,02, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, ou 110%. Em diversas modalidades, a quantidade de um destes componentes relativo à quantidade de isopreno em unidades de porcentagem por peso (ou seja, peso dos componentes dividido pelo peso do isopreno multiplicado por 100) está entre cerca de 0,01 a cerca de 105% (p/p), tal como cerca de 0,01 a cerca de 90, cerca de 0,01 a cerca de 80, cerca de 0,01 a cerca de 50, cerca de 0,01 a cerca de 20, cerca de 0,01 a cerca de 10, cerca de 0,02 a cerca de 50, cerca de 0,05 a cerca de 50, cerca de 0,1 a cerca de 50, ou 0,1 a cerca de 20% (p/p).

Em algumas modalidades, a composição de isopreno inclui um ou mais dos seguintes: um álcool, um aldeído, ou uma cetona (tais como

quaisquer alcoóis, aldeídos, ou cetonas, descritos neste documento). Em algumas modalidades, a composição de isopreno inclui (i) um álcool e um aldeído, (ii) um álcool e uma cetona, (iii) um aldeído e uma cetona, ou (iv) um álcool, um aldeído, e uma cetona.

Em algumas modalidades, a composição de isopreno contém um ou mais dos seguintes: metanol, acetaldeído, etanol, metanotiol, 1-butanol, 3-metil-1-propanol, acetona, ácido acético, 2-butanona, 2-metil-1-butanol, ou indol. Em algumas modalidades, a composição de isopreno contem 1 ppm ou mais de um ou mais dos seguintes: metanol, acetaldeído, etanol, metanotiol, 1-butanol, 3-metil-1-propanol, acetona, ácido acético, 2-butanona, 2-metil-1-butanol, ou indol. Em algumas modalidades, a concentração de mais de um ou mais dos seguintes: metanol, acetaldeído, etanol, metanotiol, 1-butanol, 3-metil-1-propanol, acetona, ácido acético, 2-butanona, 2-metil-1-butanol, ou indol, está entre cerca de 1 a cerca de 10,000 ppm em uma composição de isopreno (como gás de escape antes que este seja purificado). Em algumas modalidades, a composição de isopreno (como gás de escape após este ter sido submetido a uma ou mais etapas de purificação) inclui um ou mais dos seguintes: metanol, acetaldeído, etanol, metanotiol, 1-butanol, 3-metil-1-propanol, acetona, ácido acético, 2-butanona, 2-metil-1-butanol, ou indol, a uma concentração entre cerca de 1 a cerca de 100 ppm, tal como cerca de 1 a cerca de 10 ppm, cerca de 10 a cerca de 20 ppm, cerca de 20 a cerca de 30 ppm, cerca de 30 a cerca de 40 ppm, cerca de 40 a cerca de 50 ppm, cerca de 50 a cerca de 60 ppm, cerca de 60 a cerca de 70 ppm, cerca de 70 a cerca de 80 ppm, cerca de 80 a cerca de 90 ppm, ou cerca de 90 a cerca de 100 ppm. Compostos orgânicos voláteis de culturas de células (tais como compostos orgânicos voláteis no *headspace* das culturas de células) podem ser analisados usando métodos padronizados tais como estes descritos neste documento ou outros métodos padronizados, tais como espectrometria de massa de reação de transferência de prótons (ver, por exemplo, Bunge *et al.*, *Applied e Environmental Microbiology*, 74(7):2179-2186, 2008 que é aqui incorporado por referência em sua totalidade, relativo particularmente à análise de compostos orgânicos volá-

teis).

Em algumas modalidades, a composição compreende mais que cerca de 2 mg de isopreno, tal como maior que ou cerca de 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, ou 1000 mg de isopreno. Em algumas modalidades, a composição compreende maior que ou cerca de 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 g de isopreno. Em algumas modalidades, a quantidade de isopreno na composição está entre cerca de 2 a cerca de 5,000 mg, como entre cerca de 2 a cerca de 100 mg, cerca de 100 a cerca de 500 mg, cerca de 500 a cerca de 1,000 mg, cerca de 1,000 a cerca de 2,000 mg, ou cerca de 2,000 a cerca de 5,000 mg. Em algumas modalidades, a quantidade de isopreno na composição está entre cerca de 20 a cerca de 5,000 mg, cerca de 100 a cerca de 5,000 mg, cerca de 200 a cerca de 2,000 mg, cerca de 200 a cerca de 1,000 mg, cerca de 300 a cerca de 1,000 mg, ou cerca de 400 a cerca de 1,000 mg. Em algumas modalidades, maior que ou cerca de 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, ou 95% por peso da fração orgânica volátil da composição é isopreno.

Em algumas modalidades, a composição inclui etanol. Em algumas modalidades, a composição inclui entre cerca de 75 a cerca de 90% por peso de etanol, tal como entre cerca de 75 a cerca de 80%, cerca de 80 a cerca de 85%, ou cerca de 85 a cerca de 90% por peso de etanol. Em algumas modalidades nas quais a composição inclui etanol, a composição também inclui entre cerca de 4 a cerca de 15% por peso de isopreno, tal como entre cerca de 4 a cerca de 8%, cerca de 8 a cerca de 12%, ou cerca de 12 a cerca de 15% por peso de isopreno.

Em algumas modalidades abrangidas pela invenção, uma célula compreendendo um ou mais ácidos nucleicos heterólogos que codificam um polipeptídeo de isopreno sintase, polipeptídeo DXS, polipeptídeo IDI, e/ou polipeptídeo da via do MVA produz uma quantidade de um composto isoprenoide (tal como um composto com 10 ou mais átomos de carbono que é formado a partir da reação de uma ou mais moléculas de IPP com as moléculas de um ou mais DMAPP) que é maior do que ou cerca de 2-vezes, 3-vezes, 5-vezes, 10-vezes, 25-vezes, 50-vezes, 100-vezes, 150-vezes, 200-

vezes, 400-vezes, ou maior que a quantidade do composto isoprenoide produzido a partir de uma célula correspondente cultivada sob as mesmas condições, sem um ou mais ácidos nucleicos heterólogos. Em algumas modalidades abrangidas pela invenção, uma célula compreendendo um ou mais ácidos nucleicos heterólogos codificando um polipeptídeo de isopreno sintase, polipeptídeo DXS, polipeptídeo IDI, e/ou polipeptídeo da via do MVA produz uma quantidade de um álcool prenílico C5 (tal como 3-metil-3-buten-1-ol ou 3-metil-2-buten-1-ol) que é maior do que ou cerca de 2-vezes, 3-vezes, 5-vezes, 10-vezes, 25-vezes, 50-vezes, 100-vezes, 150-vezes, 200-vezes, 400-vezes, ou maior que a quantidade de álcool prenílico C5 produzido a partir da célula correspondente cultivada sob essencialmente as mesmas condições, sem um ou mais ácidos nucleicos heterólogos.

Métodos de Purificação de Isopreno Exemplares

Em algumas modalidades, quaisquer dos métodos descritos neste documento incluem ainda a recuperação do composto. Em algumas modalidades, quaisquer dos métodos descritos neste documento incluem ainda a recuperação de isopreno. Embora os exemplos de métodos de purificação abaixo se refiram ao isopreno, qualquer composto aqui divulgado pode ser purificado pelos métodos discutidos abaixo.

O isopreno produzido a partir das composições e métodos da invenção pode ser recuperado usando técnicas padronizadas, como a arraste gasoso, a separação de membrana reforçada, fracionamento, adsorção/dessorção, pervaporação, dessorção térmica ou a vácuo de isopreno a partir de uma fase sólida, ou na extração de isopreno imobilizado ou absorvido a uma fase sólida, com um solvente (ver, por exemplo, Patentes US N°s 4.703.007 e 4.570.029, que são, cada uma, incorporadas por referência em suas totalidades, particularmente com relação à recuperação de isopreno e métodos de purificação). Em modalidades específicas, destilação extrativa com um álcool (como etanol, metanol, propanol, ou uma combinação dos mesmos) é usada para recuperar o isopreno. Em algumas modalidades, a recuperação de isopreno envolve o isolamento de isopreno na forma líquida (como uma solução pura de isopreno ou uma solução de isopreno em um

solvente). Remoção gasosa envolve a remoção de vapor de isopreno a partir da fermentação do fluxo de gás de escape de forma contínua. Essa operação pode ser alcançada de diversas maneiras, incluindo, mas não limitado a, adsorção para uma fase sólida, a partição em uma fase líquida, ou condensação direta (como condensação devido à exposição a uma bobina de condensação ou não a um aumento da pressão). Em algumas modalidades, enriquecimento de membrana de uma corrente de vapor de isopreno diluído acima do ponto de orvalho do vapor resultante da condensação de isopreno líquido. Em algumas modalidades, o isopreno é comprimido e condensado.

A recuperação de isopreno pode envolver uma etapa ou várias etapas. Em algumas modalidades, a remoção de vapor de isopreno a partir da fermentação de efluentes gasosos e a conversão de isopreno de uma fase líquida são realizadas simultaneamente. Por exemplo, isopreno pode ser diretamente condensado do fluxo de gás de escape para formar um líquido. Em algumas modalidades, a remoção de vapor de isopreno a partir da fermentação de efluentes gasosos e a conversão de isopreno para uma fase líquida, são realizadas sequencialmente. Por exemplo, isopreno pode ser adsorvido por uma fase sólida e, em seguida, extraído da fase sólida, com um solvente.

Em algumas modalidades, quaisquer dos métodos descritos neste documento incluem ainda purificação do isopreno. Por exemplo, o isopreno produzido a partir das composições e métodos da invenção pode ser purificado por técnicas convencionais. Purificação se refere a um processo através do qual isopreno é separado de um ou mais componentes que estão presentes quando o isopreno é produzido. Em algumas modalidades, o isopreno é obtido como um líquido substancialmente puro. Exemplos de métodos de purificação incluem: (i) destilação de uma solução em um extrator líquido e (ii) cromatografia. Como usado aqui, "isopreno purificado" significa isopreno que foi separado de um ou mais componentes que estão presentes quando o isopreno é produzido. Em algumas modalidades, o isopreno é de, pelo menos, cerca de 20%, por peso, livre de outros componentes que estão presentes quando o isopreno é produzido. Em diversas modalidades, o iso-

preno é de, pelo menos, ou cerca de 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, ou 99%, por peso, puro. Pureza pode ser analisada por qualquer método apropriado, por exemplo, por cromatografia em coluna, análise HPLC, ou análise de GC-MS.

Em algumas modalidades, pelo menos uma parte da fase gasosa remanescente após uma ou mais etapas de recuperação para a remoção de isopreno é reciclada através da introdução da fase gasosa em um sistema de cultura celular (como um fermentador) para a produção de isopreno.

Em algumas modalidades, quaisquer dos métodos descritos neste documento incluem ainda polimerização do isopreno. Por exemplo, os métodos padrão podem ser usados para polimerizar o isopreno purificado para formar cis-poli-isopreno ou outros produtos de fluxo para baixo, usando métodos padrão. Assim, a invenção também apresenta um pneu compreendendo poli-isopreno, como cis-1, 4-poli-isopreno e/ou trans-1, 4-poli-isopreno feito a partir de qualquer uma das composições de isoprenos divulgadas neste documento.

Exemplos

Os exemplos, os quais se destinam a ser puramente exemplares da invenção e não devem ser considerados para limitar a invenção de forma alguma, também descrevem e detalham os aspectos e modalidades da invenção discutido acima. Salvo indicação em contrário, a temperatura está em graus centígrados e pressão é ou está próxima à atmosférica. Os exemplos anteriores e descrição detalhada são oferecidos a título de ilustração e não por meio de limitação. Todas as publicações, pedidos de patentes e patentes citadas neste relatório descritivo estão aqui incorporados por referência, como se cada publicação individual, pedido ou pedidos de patente fossem especificamente e individualmente indicada para ser incorporados por referência. Em particular, todas as publicações citadas neste documento são expressamente aqui incorporadas por referência com o objetivo de descrever e divulgar composições e metodologias que possam ser utilizadas em conexão com a invenção. Embora a invenção anterior esteja descrita em detalhes por meio de ilustração e exemplo, para fins de clareza de entendi-

mento, será prontamente aparente para aqueles com habilidade comum na récnica, à luz dos ensinamentos da presente invenção que determinadas alterações e modificações podem ser feitas, sem se afastar do espírito ou o alcance das reivindicações anexado.

Exemplo 1: Produção de isopreno em *E. coli* expressando isopreno sintase de kudzu recombinante

I. Construção de vetores para expressão de isopreno sintase de kudzu em *E. coli*

A sequência da proteína para o gene da isopreno sintase de kudzu (*Pueraria montana*) (IspS) foi obtida a partir do GenBank (AAQ84170). Um gene de isopreno sintase kudzu, otimizado para uso do códon em *E. coli*, foi comprado de DNA2.0 (SEQ ID Nº:1). O gene da isopreno sintase foi removido do plasmídeo fornecido por digestão com endonuclease de restrição *Bsp*LU11I/*Pst*I, gel purificado, e ligado em pTrcHis2B (Invitrogen) que tinham sido digeridos com *Nco*I/*Pst*I. O construto foi projetado de tal forma que o códon no gene da isopreno sintase 5' para o sítio de PstI. Como resultado, quando o construto foi expresso o marcador His não está ligado à proteína de isopreno sintase. O plasmídeo resultante, pTrcKudzu, foi verificado por sequenciamento (figuras 2 e 3).

O gene da isopreno sintase também foi clonado em pET16b (Novagen). Neste caso, o gene da isopreno sintase é inserido em pET16b de tal forma que a proteína de isopreno sintase recombinante continha o marcador His N-terminal. O gene da isopreno sintase foi amplificado a partir de pTrcKudzu por PCR usando o conjunto de iniciadores pET-His-Kudzu-2F: 5'-CGTGAGATCATATGTGTGCGACCTCTTCTCAATTTAC (SEQ ID Nº: 3) e pET-His-Kudzu-R: 5'-CGGTCGACGGATCCCTGCAGTTAGACATACATCAG CTG (SEQ ID Nº: 4). Estes iniciadores adicionaram um sítio de *Nde*I na extremidade 5' e um sítio de *Bam*H1 na extremidade 3' do gene respectivamente. O pTrcKudzu plasmídeo, acima descrito, foi utilizado como DNA molde, a polimerase Herculase (Stratagene) foi utilizada de acordo com as instruções do fabricante e os iniciadores foram adicionados a uma concentração de 10 pMols. A PCR foi realizada em um volume total de 25 µl. O produ-

to da PCR foi digerido com *NdeI*/*Bam*H1 e clonado em pET16b digerido com as mesmas enzimas. A mistura de ligação foi transformada em *E. coli* Top10 (Invitrogen) e o clone correto selecionado por sequenciamento. O plasmídeo resultante, em que o gene isopreno sintase de kudzu foi expresso a partir do promotor T7, foi designado pETNHisKudzu (figuras 4 e 5).

O gene de isopreno sintase de kudzu também foi clonado no plasmídeo de baixo número de cópias pCL1920. Os iniciadores foram usados para amplificar o gene da isopreno sintase de kudzu de pTrcKudzu descrito acima. O iniciador anterior adiciona um sítio de *Hin*dIII e uma RBS consenso *E. coli* para uma extremidade 5'. O sítio de clonagem PstI já está presente em pTrcKudzu apenas 3' do códon de parada para que o iniciador reverso seja construído de tal forma que o produto da PCR final inclua o sítio de PstI. As sequências dos iniciadores são: HindIII-RBS-Kudzu F: 5'-CATAT GAAAGCTTGTATCGATTAAATAAGGAGGAATAAACC (SEQ ID Nº: 6) e BamH1-Kudzu R: 5'- CGGTCGACGGATCCCTGCAGTTAGACATACATCAG CTG (SEQ ID Nº: 4). O produto de PCR é amplificado com a polimerase Herculase com iniciadores a uma concentração de 10 pmol e com 1 ng de DNA molde (pTrcKudzu). O protocolo de amplificação inclui 30 ciclos (95°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos). O produto é digerido com *HindIII* e *PstI* e ligado em pCL1920 que também foi digerido com HindIII e PstI. A mistura de ligação é transformada em *E. coli* Top10. Vários transformantes são verificados pelo sequenciamento. O plasmídeo resultante é designado PCL-lac-Kudzu (figuras 6 e 7).

II. Determinação de produção de isopreno

Para as culturas em frasco agitado, um mL de uma cultura é transferido de frascos agitados para frascos de *headspace* CTC de 20 mL (frasco Agilent cat# 5188 2753; cap cat# 5188 2759). A tampa é rosqueada firmemente, e os frascos incubados à temperatura equivalente com agitação a 250 rpm. Após 30 minutos, os frascos são retirados da incubadora e analisados conforme descrito abaixo (ver Tabela 1 para alguns valores experimentais obtidos neste ensaio).

Nos casos em que a produção de isopreno no fermentador é

determinada, as amostras são tomadas a partir do gás de escape do fermentador e analisadas diretamente, como descrito abaixo (ver Tabela 2 para alguns valores experimentais obtidos neste ensaio).

A análise é realizada utilizando um sistema Agilent 6890 GC/MS em interface com um amostrador automático CTC Analytics (Switzerland) CombiPAL operando no modo "*headspace*". Uma coluna CG Agilent HP-5 MS GC/MS (30 mx 0,25 mm; 0,25 espessura de filme) é usada para a separação dos analitos. O amostrador é configurado para injetar 500 µL de gás no *headspace*. O método GC/MS utiliza o hélio como gás de arraste a uma vazão de 1 ml/min. A porta de injeção é realizada a 250°C, com uma razão de separação de 50:1. A temperatura do forno é mantida a 37°C para a duração de 2 minutos da análise. O detector seletivo de massas Agilent 5793N é executado no monitoramento de íons simples (modo SIM) em m/z 67. O detector é desligado 1,4-1,7 minutos para permitir a eluição de gases de efeito permanente. Sob estas condições, observa-se que o isopreno (2-metil-1,3-butadieno) é eluído em 1,78 minutos. A tabela de calibração é utilizada para quantificar a quantidade absoluta de isopreno e é encontrada para ser linear a partir de 1 µg/L a 2000 µg/L. O limite de detecção é estimado em 50 a 100 ng/L usando este método

III. Produção de isopreno em frascos de agitação contendo células de *E. coli* expressando isopreno sintase recombinante

Os vetores descritos acima são introduzidos em *E. coli* cepa BL21 (Novagen) para produzir cepas BL21/ptrcKudzu, BL21/pCL-lac-Kudzu e BL21/pETHisKudzu. As cepas são distribuídas para o isolamento em LA (ágar Luria) carbenicilina + (50 mg/ml) e incubadas durante a noite a 37°C. Colônias individuais são inoculadas em frascos aletados de 250 ml agitados contendo 20 ml de caldo Luria Bertani (LB) e carbenicilina (100 mcg/ml). As culturas são cultivadas durante a noite a 20°C com agitação de 200 rpm. A OD_{600} das culturas durante a noite é medida e as culturas são diluídas em frascos aletados de 250 ml agitados contendo 30 ml de MagicMedia (Invitrogen) + carbenicilina (100 mcg/ml) para uma OD_{600} ~ 0,05. A cultura é incubada a 30°C com agitação de 200 rpm. Quando a OD_{600} ~ 0,5-0,8, 400 mM

de IPTG são adicionados e as células são incubadas por mais 6 horas a 30°C com agitação de 200 rpm. As 0, 2, 4 e 6 horas após a indução com IPTG, 1 ml de alíquotas das culturas é coletado, a OD_{600} é determinada e a quantidade de isopreno produzido é medida conforme é descrito acima. Os resultados são mostrados na figura 8.

IV. Produção de Isopreno a partir de BL21/ptrcKudzu em fermentação de 14 litros

A produção em larga escala de isopreno de *E. coli* recombinante contendo o gene de isopreno sintase de kudzu é determinada a partir de uma cultura em batelada alimentada. A receita para os meios de fermentação (TM2) por litro de meio de fermentação é a seguinte: K_2HPO_4 13,6 g, KH_2PO_4 13,6 g, MgSO4 * $7H_2O$ 2 g, ácido cítrico mono-hidratado 2 g, citrato de amônia férrico 0,3 g, $(NH_4)_2SO_4$ 3,2 g, extrato de levedura 5 g, Solução de Metal Traço Modificada 1000X 1ml. Todos os componentes são adicionados e dissolvidos em diH_2O. O pH é ajustado para 6,8 com hidróxido de potássio (KOH) e q.s. para volume. O produto final é esterilizado por filtração com filtro 0,22 µ (somente, não esterilizado em autoclave).A receita para Solução de Metal Traço Modificada 1000X é como se segue: ácido cítrico * H_2O 40 g, $MnSO_4$ * H_2O 30 g, NaCl 10 g, $FeSO_4$ * $7H_2O$ 1 g, $CoCl_2$ * $6H_2O$ 1 g, $ZnSO_4$ * $7H_2O$ 1 g, $CuSO_4$ * $5H_2O$ 100 mg, H_3BO_3 100 mg, $NaMoO_4$ * $2H_2O$ 100 mg. Cada componente é dissolvido um de cada vez em diH_2O, pH a 3,0 com HCl/NaOH, então q.s. para volume e esterilizado com filtro de 0,22 µ.

Este experimento é realizado em biorreator de 14 L para monitorar a formação de isopreno a partir da glicose na fermentação desejada, pH 6,7 e temperatura de 34°C. O inóculo de *E. coli* estirpe BL21/ptrcKudzu tirado de um frasco congelado é preparado em meio de peptona de soja-extrato de levedura-e glicose. Após o crescimento inóculo para OD_{550} = 0,6, dois frascos de 600 ml foram centrifugados, o conteúdo ressuspenso em 70 ml de sobrenadante para transferir o pélete celular (70 ml de material OD 3,1) para o biorreator. Por várias vezes após a inoculação, as amostras são retiradas e a quantidade de isopreno produzido é determinada como descrito acima. Os resultados são mostrados na figura 9.

Exemplo 2: Produção de isopreno em *E. coli* expressando isopreno sintase de álamo recombinante

A sequência da proteína para a isopreno sintase de álamo (*Populus alba x Populus tremula*) (Schnitzler, JP, *et al.* (2005) Planta 222:777-786) é obtida a partir do GenBank (CAC35696). Um gene com códon otimizado para *E. coli*, é comprado de DNA2.0 (p9796-álamo, figuras 30 e 31). O gene da isopreno sintase é removido do plasmídeo fornecido por digestão com endonuclease de restrição BspLU11I/PstI, purificado em gel e ligado em pTrcHis2B que havia sido digerido com NcoI/PstI. O construto é clonado tal que o códon de parada em que a inserção é antes do sítio PstI, que resulta em um construto em que o marcador His não estiver ligado à proteína isopreno sintase. O plasmídeo resultante pTrcPoplar (figuras 32 e 33), é verificado por sequenciamento.

Exemplo 2B: Demonstração de atividade de isopreno sintase a partir de várias isopreno sintases de *populus*

As seguintes isopreno sintases foram examinadas: *Populus alba* (Número de acesso BAD98243; figuras 137A e B; SEQ ID Nº: 109), *Populus nigra* (Número de acesso CAL69918; figuras 137C e D; SEQ ID Nº: 110), *Populus tremuloides* (Número de acesso AAQ16588; figura 137 E, F, e G; SEQ ID Nº: 123), *Populus trichocarpa* (Número de acesso ACD70404; figuras 137H e I; SEQ ID Nº: 111), *Populus alba x Populus tremula* (Número de acesso CAJ29303; figuras 137J e K; SEQ ID Nº: 112), e MCM112-Kudzu.

pET24Kudzu (ambém referido como MCM112) foi construído como se segue: o gene de isopreno sintase de kudzu foi subclonado no vetor pET24d (Novagen) do vetor pCR2.1 (Invitrogen). O gene de IspS de kudzu foi amplificado a partir do DNA molde de pTrcKudzu usando os iniciadores MCM50 5'-GATCATGCAT TCGCCCTTAG GAGGTAAAAAAACATGTG TGCGACCTCTTC TCAATTTACT (SEQ ID Nº: 31); e MCM53 5'-CGGTCGA CGGATCCCTGCAG TTAGACATAC ATCAGCTG (SEQ ID Nº: 32). Reações de PCR são executadas usando Taq DNA Polimerase (Invitrogen) e o produto de PCR resultante é clonado no vetor de clonagem pCR2.1-TOPO TA (Invitrogen) e transformado em células quimicamente competentes de *E. coli*

Top10 (Invitrogen). Transformantes são plaqueados em L ágar contendo carbenicilina (50 µg/mL) e incubados durante a noite a 37°C. Culturas de 5 mL de Caldo Luria contendo carbenicilina a 50 µg/ml foram inoculadas com um só transformante e cultivadas durante a noite a 37°C. Cinco colônias são triadas pelo inserto correto por sequenciamento de DNA plasmidial isolado de 1 mL de cultura líquida (Caldo Luria) e purificado usando o kit de minipreparação QIAprep Spin (Qiagen). O plasmídeo resultante, designado MCM93, contém a sequência codificante de IspS de kudzu em um arcabouço de p-CR2.1 (figura 137L). A sequência de MCM93 (SEQ ID Nº: 113) é mostrada nas figuras 137M e N.

A sequência codificante de kudzu foi removida por digestão com endonuclease de restrição com *Pci*I e *Bam*H1 (Roche) e purificada em gel usando o kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen). O DNA do vetor pET24d foi digerido com *Nco*I e *Bam*HI (Roche), tratado com fosfatase alcalina de camarão (Roche) e purificado usando o kit QIAprep Spin Mini-prep (Qiagen). O fragmento de IspS de kudzu foi ligado ao pET24d digerido com *Nco*I/*Bam*H1 usando o kit Rapid DNA Ligation (Roche) em um proporção de 5:1 de fragmento para vetor em um volume total de 20 µL. Uma parte de uma mistura de ligação (5 µL) foi transformada em células quimicamente competentes de *E. coli* Top 10 e plaqueada em L ágar contendo canamicina (50 µg/mL). O transformante correto foi confirmado por sequenciamento e transformado em células BL21(λDE3)pLysS quimicamente competentes (Novagen). Uma única colônia foi selecionada após o crescimento durante a noite a 37°C em L ágar contendo canamicina (50 µg/mL). Um mapa do plasmídeo resultante designado como pET24D-Kudzu é mostrado na figura 137O. A sequência de pET24D-Kudzu (SEQ ID Nº: 114) é mostrada nas figuras 137P e Q.

Genes de isopreno sintase otimizados para *Escherichia coli* clonados no vetor de expressão pET24a (Novagen) foram adquiridos da DNA2.0 (Menlo Park, CA) para *Populus tremuloides*, *Populus alba*, *Populus nigra* e *Populus trichocarpa*. Os genes foram sintetizados com a sequência peptídica de endereçamento ao cloroplasto removida, resultando na expressão de proteínas maduras.

O construto para a isopreno sintase de kudzu foi usado como controle neste exemplo. Os plasmídeos foram transformados no hospedeiro de expressão de *E. coli* BL21(DE3)pLysS e transformantes foram cultivados em 0,6mL de meio TM3. A receita do meio TM3 é como se segue: K_2HPO_4 (13,6 g/L) KH_2PO_4 (13,6 g/L), $MgSO_4$ * $7H_2O$ (2 g/L) ácido cítrico mono-hidratado (2 g/L) citrato de amônio férrico (0,3 g/L) $(NH_4)_2SO_4$ (3,2 g/L) extrato de levedura (0,2 g/L) 1 mL de solução de Elementos Traços 1000x, pH ajustado a 6,8 com hidróxido de amônio qs até o volume com DI H_2O estéril e esterilizado por filtração em filtro de 0,22 mícrons. A receita para a solução de Elementos Traços 1000x é como se segue: ácidos cítricos * H_2O (40 g/L), $MnSO_4$ * H_2O (30 g/L), NaCl (10 g/L), $FeSO_4$ * 7 H_2O (1 g/L), $CoCl_2$ * 6 H_2O (1 g/L), $ZnSO_4$ * 7 H_2O (1 g/L), $CuSO_4$ * 5 H_2O (100 mg/L), H_3BO_3 (100 mg/L), $NaMoO_4$ * 2 H_2O (100 mg/L). Os componentes são dissolvidos um por vez em Di H_2O, pH ajustado a 3,0 com HCl/NaOH, q.s. até o volume e esterilizados por filtração em filtro de 0,22 mícrons.

As culturas foram induzidas com 400uM de IPTG e o cultivo foi continuado até OD_{600} de cerca de 5. Alíquotas de cultura foram transferidas para uma placa de vidro de poços profundos e os poços foram selados com selante de placa de alumínio. A placa foi incubada a 25°C por 30 minutos com agitação a 450 rpm. As reações foram inativadas por calor pela elevação da temperatura a 70°C por 5 minutos. O *headspace* de célula inteira foi medido pelo método GCMS como descrito no Exemplo 1, Parte II.

Valores de K_m foram obtidos de culturas cultivadas de modo similar, mas as células foram coletadas e lisadas por um protocolo de lisozima e congelamento/descongelamento. Um volume de 400 µL de cultura foi transferido para uma placa de 96 poços nova (Perkin Elmer, Nº do catálogo 6008290) e células foram coletadas por centrifugação em uma centrífuga Beckman Coulter Allegra 6R a 2500 x g. O sedimentado foi ressuspendido em 200 mL de tampão hipotônico (5 mM de $MgCL_2$, 5 mM de Tris HCl, 5 mM de DTT pH 8,0) e a placa foi congelada a -80°C por um tempo mínimo de 60 minutos. O lisado celular foi preparado pelo descongelamento da placa e adição de 32 mL de tampão de ensaio DMAPP de isopreno sintase (57 mM

de Tris HCl, 19 mM de $MgCl_2$, 74 mg/mL de DNase I (Sigma Nº do catálogo DN-25), $2,63x10^5$ U/mL de solução de lisozima ReadyLyse (Epicentre Nº do catálogo R1802M), e 5 mg/mL de BSA grau biologia molecular. A placa foi incubada com agitação a 25°C por 30 minutos e em seguida colocada em gelo. DMAPP e o lisado foram adicionados na concentração desejada em um bloco de vidro de poço profundo selado para o ensaio *head space* de célula inteira descrito acima. As reações prosseguiram por 1 hora e em seguida terminadas pela etapa de aquecimento descrita acima e a atividade *head space* foi medida também como descrito.

Em uma abordagem alternativa, a atividade das enzimas foi medida de células cultivadas em 25mL de volume e induzida de modo similar ao descrito acima. Células foram coletadas por centrifugação e os sedimentados foram lisados por prensagem francesa em tampão que consistia em 50% de glicerol misturado 1:1 com 20 mM de Tris/HCl pH 7,4, 20 mM de $MgCl_2$, 200 mM de KCl, 1 mM de DTT. Um volume de lisado de 25 uL foi avaliado pela atividade de isopreno sintase em frascos de tampa rosqueada de 2 mL contendo 75 uL de tampão de ensaio (66,6 mM deTris/HCl pH 8, 6,66 mM de DMAPP, 43 mM, $MgCl_2$). A reação foi incubada por 15 minutos a 30°C e foi interrompida pela adição de 100uL de EDTA a 250 mM através do septo do frasco. O isopreno foi medido por GC/MS como descrito no Exemplo 1, Parte II.

Todos os métodos para determinação de atividade mostraram que a enzima de álamo derivada dos álamos de linhagem pura era várias vezes maior que a de *Populus* [*Alba x tremula*]. As figuras 138 e 139 mostram esses resultados para o ensaio *head space* de célula inteira e para o ensaio de DMAPP, respectivamente,e surpreendentemente indica que enzimas de *P. nigra, P. tremuloides, P. trichocarpa* e *P. Alba*, todas, tiveram atividade significativamente maior que a do híbrido[*P. alba x P.tremula*].

O ensaio DMAPP foi realizado como se sege: um volume de 400 µL de cultura foi transferido para uma placa de 96 poços nova (Perkin Elmer, No. do catálogo 6008290) e células foram coletadas por centrifugação em uma centrífuga Beckman Coulter Allegra 6R a 2500 x g. O sedimentado foi

ressuspendido em 200 mL de tampão hipotônico (5 mM de $MgCL_2$, 5 mM de Tris HCl, 5 mM de DTT pH 8,0) e a placa foi congelada a -80°C por um tempo mínimo de 60 minutos. O lisado celular foi preparado pelo descongelamento da placa e adição de 32 mL de tampão de ensaio DMAPP de isopreno sintase (57 mM de Tris HCl, 19 mM de $MgCl_2$, 74 mg/mL de DNase I (Sigma Nº do catálogo DN-25), $2,63x10^5$ U/mL de solução de lisozima ReadyLyse (Epicentre Nº do catálogo R1802M), e 5 mg/mL de BSA grau biologia molecular. A placa foi incubada com agitação a 25°C por 30 minutos e em seguida colocada em gelo. Para a produção de isopreno uma alíquota de 80mL de lisado foi transferida para uma placa de vidro de 96 poços profundos (Zinsser Nº do catálogo 3600600) e 20 mL de uma solução 10 mM de DMAPP em 100 mM de $KHPO_4$, pH 8,2 (Cayman Chemical Nº do catálogo. 63180) foram adicionados. A placa foi selada com selante de placa de alumínio (Beckman Coulter Catalog Nº 538619) e incubada com agitação a 30°C por 60 minutos. As reações enzimáticas foram terminadas pelo aquecimento do bloco de vidro (70°C por 5 minutos). O *head space* celular de cada poço foi analisado quantitativamente como descrito no Exemplo I, Parte II.

Notavelmente *P. alba, P.tremuloides, P. trichocarpa* tiveram atividade maior que a isopreno sintase de kudzu, A enzima de *P. Alba* foi expressa com a maior atividade de todas as enzimas testadas. As maiores atividades observadas com o lisado celular comparadas com o ensaio de *head space* celular provavelmente foram devidas a limitações em DMAPP, o substrato para essas enzimas, distribuído pela via do desóxi-xilulose 5-fosfato (DXP) endógena da célula.

Parâmetros cinéticos de K_m foram medidos como sendo cerca de 2 a 3 mM para todas as enzimas para as quais o valor foi determinado.

Exemplo 3: Produção de isopreno em *Pantoea citrea* expressando isopreno sintase de kudzu recombinante

Os plasmídeos pTrcKudzu e pCL-lac Kudzu descritos no Exemplo 1 são eletroporados em *P.citrea* (Pat. EUA Nº 7241587). Transformantes são selecionados em LA contendo carbenicilina (200 mcg/ml) ou espectino-

micina (50 mg/ml), respectivamente. Produção de isopreno de agitador e determinação da quantidade de isopreno produzidos são realizadas, conforme descrito no Exemplo 1 para cepas de *E. coli* expressando isopreno sintase recombinante de kudzu. Os resultados são mostrados na figura 10.

Exemplo 4: Produção de isopreno em *Bacillus subtilis* expressando isopreno sintase de kudzu recombinante

I. Construção de um plasmídeo replicante de *B. subtilis* para a expressão de isopreno sintase de kudzu

O gene da isopreno sintase de kudzu é expresso em cepa de *Bacillus subtilis aprEnprE Pxyl-comK* (BG3594comK) usando um plasmídeo replicante (pBS19 com um cassete de resistência a cloranfenicol) sob controle do promotor *aprE*. O gene da isopreno sintase, o promoter *aprE* e o terminador de transcrição são amplificados separadamente e fundidos usando PCR. O construto é então clonado em pBS19 e transformado em *B. subtilis*.

a) Amplificação do promoter *aprE*

O promotor *aprE* é amplificado a partir do DNA cromossômico de *Bacillus subtilis* usando os seguintes iniciadores:

CF 797 (+) Iniciar promotor aprE MfeI

5'-GACATCAATTGCTCCATTTTCTTCTGCTATC

(SEQ ID Nº: 58)

CF 07-43 (-) Fundir promotor aprE ao Kudzu ispS

5'-ATTGAGAAGAGGTCGCACACACTCTTTACCCTCTCCTTTTA

(SEQ ID Nº: 59)

b) Amplificação do gene da isopreno sintase

O gene da isopreno sintase de kudzu é amplificado a partir de plasmídeo pTrcKudzu (SEQ ID Nº: 2). O gene é códon otimizado para *E. coli* e sintetizado pelo DNA 2.0. Os seguintes iniciadores são usados:

CF 07-42 (+) Fundir o promotor aprE ao gene sintase de isopreno kudzu (GTG iniciar códon)

5'-TAAAAGGAGAGGGTAAAGAGTGTGTGCGACCTCTTCTCA

AT (SEQ ID Nº: 60)

CF 07-45 (-) Fundir a extremidade 3' do gene sintase de isopreno kudzu ao terminador

5'-CCAAGGCCGGTTTTTTTTAGACATACATCAGCTGGTTAATC (SEQ ID Nº: 61)

c) Amplificação de transcrição de terminador

O terminador da serina protease alcalina de *Bacillus amyliquefaciens* é amplificado a partir de um plasmídeo previamente sequenciado p-JHPms382 usando os seguintes iniciadores:

CF 07-44 (+) Fundir a extremidade 3' do gene sintase de isopreno kudzu ao terminador

5'-GATTAACCAGCTGATGTATGTCTAAAAAAAACCGGCCTTGG (SEQ ID Nº: 62)

CF 07-46 (-) Final do terminador de *B. amyliquefaciens* (BamHI)

5'-GACATGACGGATCCGATTACGAATGCCGTCTC (SEQ ID Nº: 63)

O fragmento kudzu é fundido ao fragmento terminador usando PCR com os seguintes iniciadores

CF 07-42 (+) Fundir promotor aprE ao gene de isopreno sintase de kudzu (GTG códon inicial)

5'-TAAAAGGAGAGGGTAAAGAGTGTGTGCGACCTCTTCTCA AT (SEQ ID Nº: 61)

CF 07-46 (-) Final de *B. amyliquefaciens* terminador (BamHI)

5'-GACATGACGGATCCGATTACGAATGCCGTCTC

(SEQ ID Nº: 63)

O fragmento kudzu é fundido ao fragmento promotor usando PCR com os seguintes iniciadores:

CF 797 (+) Iniciar promotor *aprE* MfeI

5'-GACATCAATTGCTCCATTTTCTTCTGCTATC

(SEQ ID Nº: 64)

CF 07-46 (-) Final do *B. amyliquefaciens* terminador (BamHI)

5'- GACATGACGGATCCGATTACGAATGCCGTCTC

(SEQ ID Nº: 63)

O fragmento de PCR de fusão é purificado usando um kit Qiagen e digerido com as enzimas de restrição BamHI e MfeI. Este fragmento de DNA digerido é purificado com gel, usando um kit Qiagen e ligado a um vetor conhecido como pBS19, que foi digerido com EcoRI e BamHI e gel purificado.

A mistura de ligação é transformada em células de *E. coli* Top 10 e colônias são selecionadas em placas de LA+50 de carbenicilina. Um total de seis colônias é escolhido e cultivado durante a noite em LB+ 50 de carbenicilina e, em seguida, os plasmídeos são isolados, usando um kit Qiagen. Os plasmídeos são digeridos com EcoRI e BamHI para verificar se insere e três dos plasmídeos corretos são enviados para sequenciamento com os seguintes iniciadores.

CF 149 (+) EcoRI inicial de promotor *aprE*

5'-GACATGAATTCCTCCATTTTCTTCTGC (SEQ ID Nº: 65)

CF 847 (+) Sequência em pXX 049 (final do promotor *aprE*)

5'-AGGAGAGGGTAAAGAGTGAG (SEQ ID Nº: 66)

CF 07-45 (-) Fundir a extremidade 3' de sintase de isopreno kudzu ao terminador

5'-CCAAGGCCGGTTTTTTTTAGACATACATCAGCTGGTTAATC (SEQ ID Nº: 61)

CF 07-48 (+) Sequenciar iniciador para isopreno sintase de kudzu

5'-CTTTTCCATCACCCACCTGAAG (SEQ ID Nº: 67)

CF 07-49 (+) Sequenciar em isopreno sintase de kudzu

5'-GGCGAAATGGTCCAACAACAAAATTATC (SEQ ID Nº: 68)

O plasmídio designado PBS Kudzu # 2 (figuras 52 e 12) está correto pelo sequenciamento e é transformado em BG 3594 comK, uma cepa hospedeira de *Bacillus subtilis*. A seleção é feita em placas de LA + 5 de cloranfenicol. Um transformante é escolhido e atinge as colônias únicas em LA + 5 de cloranfenicol, cultivadas em LB + 5 de cloranfenicol até que ele atinja um OD_{600} de 1,5. Ele é armazenado congelado em um frasco a -80 °C na presença de glicerol. A cepa resultante é designada CF 443.

II. Produção de isopreno em frascos de agitação contendo células de *B. subtilis* expressando isopreno sintase recombinante

Culturas de um dia para o outro são inoculadas com uma única colônia da CF 443 a partir de uma LA + cloranfenicol (Cm, 25 mcg/ml). As culturas são cultivadas em LB + Cm a 37°C com agitação de 200 rpm. Essas culturas de um dia para o outro (1 mL) são utilizadas para inocular 250 ml em frascos agitados contendo 25 ml de meio Grants II e cloranfenicol, na concentração final de 25 µg/ml. Receita para Meio Grants II é 10 g de peptona de soja, 3 ml de 1M de K_2HPO_4, 75 g de glicose, 3,6 g de ureia, 100 ml de MOPS 10X, q.s. para 1 L com H_2O, pH 7,2; 10X MOPS receita era 83,72 g MOPS, 7,17 g de tricina, 12 g de péletes de KOH, 10 ml de solução 0,276M K_2SO_4, 10 ml de solução 0.528M $MgCl_2$, 29,22 g de NaCl, 100 ml de micronutrientes 100X, q.s. para 1 L com H_2O; e receita de 100X micronutrientes é 1,47 g $CaCl_2*2H_2O$, 0,4 g $FeSO_4*7H_20$, 0,1 g $MnSO_4*H_20$, 0,1 g $ZnSO_4*H_2O$, 0,05 g $CuCl_2*2H_2O$, 0,1 g $CoCl_2*6H_2O$, 0,1 g $Na_2MoO_4*2H_2O$, q.s. para 1 L com H_2O. Frascos de agitação são incubados a 37°C e as amostras são colhidas em 18, 24 e 44 horas. Às 18 horas o "*headspace*" da CF443 e da cepa controle são amostrados. Isso representa 18 horas de acúmulo de isopreno. A quantidade de isopreno é determinada por cromatografia gasosa, conforme descrito no Exemplo 1. A produção de isopreno é reforçada significativamente pela expressão de isopreno sintase recombinante (figura 11).

III. Produção de isopreno por CF443 em fermentação de 14 L

A produção em larga escala de isopreno de *B. subtilis* recombinante contendo o gene de isopreno sintase de kudzu em um plasmídeo de replicação é determinada a partir de uma cultura em batelada alimentada. A cepa de *Bacillus* CF 443, expressando um gene de isopreno sintase de kudzu ou cepa controle que não expressa um gene de isopreno sintase de kudzu são cultivadas por fermentação em batelada alimentada convencionais em um meio nutriente contendo farelo de soja (Cargill), de sódio e fosfato de potássio, sulfato de magnésio e uma solução de ácido cítrico, cloreto férrico e cloreto de manganês. Antes da fermentação, a mídia é macerada por 90 minutos, utilizando uma mistura de enzimas, incluindo celulases, pectinases e hemicelulases (ver, WO95/04134). Fermentações 14-L são alimentadas

com 60% peso/peso de glicose (dextrose DE99 Cargill, ADM verdes Versadex Danisco ou açúcar invertido) e 99% em peso/peso do óleo (óleo de soja Família Ocidental, onde o peso de 99%/peso é a concentração do petróleo antes que ele foi adicionado ao meio de cultura celular). Alimentação é iniciada quando a glicose no lote não é detectável. A taxa de alimentação é elevada durante várias horas e é ajustada para adicionar o óleo em uma base de carbono equivalente. O pH é controlado em 6,8-7,4 usando 28% peso/volume de hidróxido de amônio. Em caso de formação de espuma, antiespumante é adicionado à mídia. A temperatura de fermentação controlada a 37°C e a cultura de fermentação é agitada a 750 rpm. Vários outros parâmetros tais como pH, OD%, o fluxo de ar e pressão são monitorados durante todo o processo. A DO% é mantida acima de 20. As amostras são colhidas ao longo do tempo de 36 horas e analisadas para o crescimento de células (OD_{550}) e produção de isopreno. Os resultados desses experimentos são apresentados nas figuras 53A e 53B.

IV. Integração de isopreno sintase de kudzu (ispS) em *B. subtilis.*

O gene de isopreno sintase de kudzu é clonado em um plasmídeo de integração (pJH101-cmpR) sob o controle do promotor aprE. Sob as condições testadas, nenhum isopreno é detectado.

Exemplo 5: Produção de isopreno em *Trichoderma*

I. Construção de vetores para expressão da isopreno sintase de kudzu em *Trichoderma reesei*

O gene IS de kudzu com códon otimizado para *Yarrowia lipolytica* é sintetizado pelo DNA 2.0 (SEQ ID Nº: 8) (figura 13). Este plasmídio, serve como molde para a seguinte reação de PCR: 1 µl de molde de plasmídeo (20 ng/ul), 1 µl de Iniciador EL-945 (10 uM) 5'-GCTTATGGATCCTCTA GACTATTACACGTACATCAATTGG (SEQ ID Nº: 9), 1 µl de Iniciador EL-965 (10uM) 5'-CACCATGTGTGCAACCTCCTCCCAGTTTAC (SEQ ID Nº: 10), 1 µl de dNTP (10mM), 5 µl 10x PfuUltra II Fusion HS DNA Polimerase Buffer, 1 µl de PfuUltra II Fusion HS DNA Polimerase, 40 µl de água em um volume total de reação de 50 ul. O iniciador direto contém 4 nucleotídeos adicionais na extremidade 5' que não correspondem ao gene de isopreno

sintase de kudzu com códon otimizado para *Y. lipolytica*, mas são necessários para a clonagem no vetor pENTR/D-TOPO. O iniciador reverso contém 21 nucleotídeos adicionais na extremidade 5' que não correspondem ao gene de isopreno sintase de kudzu com códon otimizado para *Y. lipolytica*, mas são inseridos para clonagem de outros arcabouços de vetores. Usando o MJ Research PTC-200 Termociclador, a reação de PCR é realizada da seguinte forma: 95°C por 2 minutos (primeiro ciclo só), 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos (Repita o procedimento para 27 ciclos), 72°C por 1 minuto após o último ciclo. O produto da PCR é analisado em um E-gel 1,2% para confirmar a amplificação bem-sucedida do gene de isopreno sintase de kudzu com códon otimizado para *Y. lipolytica*.

O produto de PCR é então clonado usando o seguinte protocolo do fabricante para o kit de clonagem TOPO pENTR/D-TOPO: 1 ml de reação de PCR, 1 ml de solução salina, 1 ml de vetor TOPO pENTR/D TOPO e 3 µl de água em uma reação com total de volume de 6µL. A reação é incubada em temperatura ambiente por 5 minutos. Um microlitro de reação TOPO é transformado em células quimicamente competentes de *E. coli* TOP10. Os transformantes são selecionados em placas LA + 50 mg/mL de canamicina. Várias colônias são escolhidas e cada uma é inoculada em um tubo de 5 ml contendo LB + 50 mg de canamicina/ml e as culturas cultivadas durante a noite a 37°C com agitação de 200 rpm. Plasmídeos são isolados dos tubos de cultura durante a noite usando QIAprep Spin Miniprep Kit, seguindo o protocolo do fabricante. Vários são os plasmídeos sequenciados para verificar se a sequência de DNA está correta.

Um único plasmídeo pENTR/D-TOPO codificando um gene de isopreno sintase de kudzu com códon otimizado para *Y. lipolytica* é usado para clonagem Gateway em um vetor pTrex3g feito sob medida. Construção de pTrex3g é descrita no WO 2005/001036 A2. A reação é realizada seguindo o protocolo do fabricante para o kit LR Gateway Clonase II Enzima Mix (Invitrogen): 1 ml de vetor doador pENTR/D-TOPO de gene de isopreno sintase de kudzu com códon otimizado para *Y. lipolytica*, 1 ml do vetor de destino pTrex3g, 6 µl de tampão TE, PH 8,0 em um volume total de reação de 8

µl. A reação é incubada em temperatura ambiente por uma hora e, em seguida, 1 ml de solução de proteinase K é adicionado e a incubação prosseguiu a 37°C por 10 minutos. Em seguida, 1 ml de reação é transformado em células quimicamente competentes de E. coli TOP10. Os transformantes são selecionados em placas /LA + 50 mg ml carbenicilina. Várias colônias são escolhidas e cada uma é inoculada em um tubo de 5 ml contendo LB + 50 µlg carbenicilina/ml e as culturas são cultivadas durante a noite a 37°C com agitação de 200 rpm. Plasmídeos são isolados dos tubos de cultura durante a noite usando QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Inc.), seguindo o protocolo do fabricante. Vários são os plasmídeos sequenciados para verificar se a sequência de DNA foi correta.

Transformação biobalística de plasmídeo pTrex3g com isopreno sintase de kudzu com códon otimizado para *Y. lipolytica* (figura 14) em um quad exclui cepa de *Trichoderma reesei* é realizada através do sistema de distribuição de partícula PDS-1000/HE de biobalística (ver WO 2005/001036 A2). Isolamento de transformantes estáveis e avaliação de frasco de agitação são realizados usando o protocolo enumerado no Exemplo 11 da publicação de patentes WO 2005/001036 A2.

II. Produção de isopreno em cepas recombinantes de *T. reesei*

Um mL de 15 e 36 horas culturas antigas dos transformantes isopreno sintase descritos acima são transferidos para frascos de cabeça no espaço. Os frascos são lacrados e incubados por 5 horas a 30 °C. O gás *headspace* é medido e isopreno é identificado pelo método descrito no Exemplo 1. Dois dos transformantes mostram traços de isopreno. A quantidade de isopreno pode ser aumentada por uma incubação de 14 horas. As duas amostras positivas mostram isopreno em níveis de cerca de 0,5 mg/L para a incubação de 14 horas. O controle não transformado não apresenta níveis detectáveis de isopreno. Este experimento mostra que *T. reesei* é capaz de produzir isopreno a partir de precursor endógeno quando fornecido com uma isopreno sintase exógena.

Exemplo 6: Produção de isopreno em *Yarrowia*

I. Construção de vetores para expressão de isopreno sintase de kudzu em

Yarrowia lipolytica.

O ponto de partida para a construção de vetores para a expressão do gene da isopreno sintase de kudzu em *Yarrowia lipolytica* é o vetor pSPZ1 (MAP29Spb). A sequência completa desse vetor (SEQ ID Nº:11) é mostrada na figura 15.

Os fragmentos a seguir são amplificados por PCR usando DNA cromossômico de uma cepa de *Y. lipolytica* GICC 120285 como molde: uma forma sem promotor do gene URA3, um fragmento do gene do RNA ribossomal 18S, um terminador de transcrição do gene XPR2 de *Y. lipolytica* e dois fragmentos de DNA contendo os promotores de genes e XPR2 e ICL1. Os seguintes iniciadores de PCR são utilizados:

ICL1 3

5'-GGTGAATTCAGTCTACTGGGGATTCCCAAATCTATATATC TGCAGGTGAC (SEQ ID Nº: 69)

ICL1 5

5'-GCAGGTGGGAAACTATGCACTCC (SEQ ID Nº: 70)

XPR 3

5'-CCTGAATTCTGTTGGATTGGAGGATTGGATAGTGGG (SEQ ID Nº: 71)

XPR 5

5'-GGTGTCGACGTACGGTCGAGCTTATTGACC (SEQ ID Nº: 72)

XPRT3

5'-GGTGGGCCCGCATTTTGCCACCTACAAGCCAG (SEQ ID Nº: 73)

XPRT 5

5'-GGTGAATTCTAGAGGATCCCAACGCTGTTGCCTACAACG G (SEQ ID Nº: 74)

Y18S3

5'-GGTGCGGCCGCTGTCTGGACCTGGTGAGTTTCCCCG (SEQ ID Nº: 75)

Y18S 5

5'-GGTGGGCCCATTAAATCAGTTATCGTTTATTTGATAG (SEQ ID Nº: 76)

YURA3

5'-GGTGACCAGCAAGTCCATGGGTGGTTTGATCATGG (SEQ ID Nº: 77)

YURA 50

5'-GGTGCGGCCGCCTTTGGAGTACGACTCCAACTATG (SEQ ID Nº: 78)

YURA 51

5'-GCGGCCGCAGACTAAATTTATTTCAGTCTCC (SEQ ID Nº: 79)

Para amplificação por PCR, a polimerase PfuUltraII (Stratagene), tampão fornecido pelo fornecedor e dNTPs, 2,5 mM de iniciadores e o DNA molde indicado são utilizados de acordo com as instruções do fabricante. A amplificação é feita através do seguinte ciclo: 95°C por 1 min; 34x (95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 3 min) e 10 min a 72°C seguidos de 4°C de incubação.

Moléculas sintéticas de DNA codificando o gene da isopreno sintase de kudzu, com códon otimizado para a expressão em *Yarrowia*, são obtidas a partir do DNA 2.0 (figura 16; SEQ ID Nº:12). Detalhe completo do esquema de construção dos plasmídeos pYLA(KZ1) e pYLI(KZ1) carregando o gene da isopreno sintase de kudzu sob o controle dos promotores XPR2 e ICL1, respectivamente, é apresentado na figura 18. Plasmídeos de controle no qual um gene do fator de acoplamento (MAP29) é inserido no lugar de um gene da isopreno sintase são igualmente construídos (figuras 18E e 18F).

Um procedimento de clonagem semelhante pode ser usado para expressar um gene de isopreno sintase de Álamo (*Populus alba x Populus tremula*. A sequência do isopreno de Álamo é descrita em Miller B. *et al.* (2001) *Planta* 213, 483-487 e mostrada na figura 17 (SEQ ID Nº:13). Um esquema de construção para a geração dos plasmídeos pYLA (POP1) e pYLI(POP1) contendo o gene de isopreno sintase de Álamo sob o controle

dos promotores,XPR2 e ICL1 respectivamente, é apresentado nas figuras 18A e B.

II. Produção de isopreno por cepas recombinantes de *Y. lipolytica.*

Os vetores pYLA(KZ1), pYLI(KZ1), pYLA(MAP29) e pYLI (MAP29) são digeridos com *SacII* e usados para transformar a cepa Y. *lipolytica* CLIB 122 por um procedimento de acetato de lítio padrão/polietileno glicol de uridina prototrofica. Resumidamente, as células de levedura cultivadas em YEPD (1% de extrato de levedura, peptona a 2%, 2% de glicose) durante a noite, são coletadas por centrifugação (4000 rpm, 10 min), lavadas uma vez com água estéril e suspensas em acetato de lítio a 0,1 M, pH 6,0. Alíquotas de duzentos µl da suspensão de células são misturadas com uma solução de DNA plasmidial linearizado (10-20 mg), incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente e misturadas com 1 ml de 50% de PEG 4000 no mesmo tampão. As suspensões são adicionalmente incubadas por uma hora à temperatura ambiente, seguido por um choque térmico de 2 minutos a 42°C. As células são então semeadas em placas de SC his leu (0,67% de base nitrogenada de levedura, 2% de glicose, 100 mg/L de leucina e histidina). Transformantes aparecem após 3-4 dias de incubação a 30°C.

Três isolados a partir da transformação PYLA (KZ1), três isolados a partir da transformação (KZ1) Pyli, dois isolados do (MAP29) PYLA transformação e dois isolados do Pyli (MAP29) transformação são cultivados por 24 horas em meio YEP7 (1% de extrato de levedura, peptona 2%, pH 7,0) a 30°C com agitação. Células de 10 ml de cultura são coletadas por centrifugação, ressuspendidas em 3 ml de YEP7 fresco e colocadas em frascos de 15 ml com tampa de rosca. Os frascos são incubados durante a noite em temperatura ambiente, com suave (60 rpm) agitação. O conteúdo de isopreno no *headspace* dos frascos é analisado por cromatografia gasosa com detector de espectrometria de massa, como descrito no Exemplo 1. Todos os transformantes obtidos com PYLA (KZ1) e Pyli (KZ1) produziram facilmente uma quantidade detectável de isopreno (0,5 mg/L para 1 mg/L, figura 20). Nenhum isopreno é detectado no *headspace* das amostras de controle portadoras do gene da fitase, em vez de um gene de isopreno sintase

Exemplo 7: Produção de isopreno em *E. coli* expressando isopreno sintase de kudzu e *idi*, ou *dxs*, ou *idi* e *dxs*

I. Construção de vetores codificando isopreno sintase de kudzu e *idi*, ou *dxs*, ou *idi* e *dxs* para a produção de isopreno em *E. coli*

i) Construção de pTrcKudzuKan

O gene *bla* de pTrcKudzu (descrito no Exemplo 1) é substituído com o gene que confere resistência à canamicina. Para remover o gene bla, pTrcKudzu é digerido com BspHI, tratado com Fosfatase Alcalina de Camarão (SAP), aquecido a 65°C, em seguida, tem as extremidades preenchidas por fragmento Klenow e dNTPs. O fragmento de 5 kbp grande é purificado a partir de um gel de agarose e ligado ao gene kanR que tem sido amplificado de PCR-Blunt-II-TOPO utilizando os iniciadoresMCM22 5'- GATCAAGCTTAACCGGAATTGCCAGCTG (SEQ ID Nº: 14) e MCM23 5'- GATCCGATCGTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGC (SEQ ID Nº: 15), digerido com *Hind*III e *Pvu*I, e finalmente preenchido. Um transformante carregando um plasmídeo que confere resistência à canamicina (pTrcKudzuKan) é selecionado em LA contendo canamicina 50 µg/ml.

ii) Construção de pTrcKudzu yIDI Kan

O TrcKudzuKan é digerido com PstI, tratado com a SAP, aquecido e gel purificado. Ele é ligado a um produto de PCR codificando *idi* de *S. cerevisiae* com um RBS sintético. Os iniciadores para PCR NsiI-YIDI 1 F 5'-CATCAATGCATCGCCCTTAGGAGGTAAAAAAAAATGAC (SEQ ID Nº: 16) e PstI-YIDI 1 R 5'- CCTTCTGCAGGACGCGTTGTTATAGC (SEQ ID Nº: 17); e o molde são DNA genômico de *S. cerevisiae*. O produto da PCR é digerido com NsiI e PstI e gel purificado antes da ligação. A mistura de ligação é transformada em células TOP10 quimicamente competentes e selecionada em LA contendo 50 mg/ml de canamicina. Transformantes vários são isolados e sequenciados e o plasmídeo resultante é chamado yIDI pTrcKudzu (kan) (figuras 34 e 35).

iii) Construção de pTrcKudzu DXS Kan

Plasmídeo pTrcKudzuKan é digerido com PstI, tratado com a SAP, aquecido e gel purificado. Ele é ligado a um produto da PCR de codifi-

cação de *E. coli dxs* com um RBS sintético. Os iniciadores para PCR MCM13 5'-GATCATGCATTCGCCCTTAGGAGGTAAAAAA ACATGAGTTT-GATATTGCCAAATACCCG (SEQ ID Nº: 18) e MCM14 5'- CATGCTG-CAGTTATGCCAGCCAGGCCTTGAT (SEQ ID Nº: 19); e do modelo são a *E. coli* DNA genômico. O produto da PCR é digerido com NsiI e PstI e gel purificado antes da ligação. A reação de transformação resultante é transformada em células TOP10 e selecionada em LA com 50 mg de canamicina/ml. Transformantes vários são isolados e sequenciados e o plasmídeo resultante é chamado pTrcKudzu-DXS (kan) (figuras 36 e 37).

iv) Construção de pTrcKudzu-yIDI-dxs (kan)

O TrcKudzu-yIDI(kan) é digerido com *Pst*I, tratado com a SAP, aquecido e gel purificado. Ele é ligado a um produto PCR de codificação de *E. coli dxs* com um RBS sintético. (iniciadores MCM13 5'-GATCATGCATT CGCCCTTAGGAGGTAAAAAAACATGAGTTTTGATATTGCCAAATACCCG (SEQ ID Nº: 18) e MCM14 5'- CATGCTGCAGTTATGCCAGCCAGGCCTTG AT (SEQ ID Nº: 19); modelo de células TOP10) que foram digeridos com NsiI e PstI e gel purificado. O plasmídeo final é chamado pTrcKudzu-yIDI-dxs (kan) (figuras 21 e 22).

v) Construção de pCL PtrcKudzu

Um fragmento de DNA contendo o promotor, o gene estrutural e de terminação de Exemplo 1 acima é digerido de pTrcKudzu usando SSPI e gel purificado. É ligado ao pCL1920 que foi digerido com PvuII, tratado com SAP e morta por calor. A mistura resultante da ligadura foi transformada em células TOP10 e selecionada em LA, contendo 50 mcg de espectinomicina/ml. Vários clones estão isolados e sequenciados e dois são selecionados. PtrcKudzu PCL e PCL PtrcKudzu (A3) têm a inserir em orientações opostas (figuras 38-41).

vi) Construção de pCL PtrcKudzu yIDI

O *NsiI-PstI* digerido, gel purificado, IDI PCR amplicon do (ii) acima mencionado são ligados dentro do pCL PtrcKudzu que tem sido digerido com *Pst*I, tratado com SAP, e aquecido. A mistura de ligadura é transformada em células TOP10 e selecionada em LA contendo 50 µg/ml de especti-

nomicina. Diversos clones são isolados e sequenciados e o plasmídeo resultante é chamado pCL PtrcKudzu yIDI (figuras 42 e 43).

vii) Construção de pCL PtrcKudzu DXS

O NsiI-PstI digerido, gel purificado, DXS PCR amplicon a partir de (iii) acima são ligados em pCL PtrcKudzu (A3), que foi digerido com PstI, tratados com a SAP, e aquecidos . A mistura de ligadura é transformada em células TOP10 e selecionada em LA, contendo 50 mcg/ ml de espectinomicina . Diversos clones são isolados e sequenciados e o plasmídeo resultante é chamado PCL PtrcKudzu DXS (figuras 44 e 45)

II. Medição de isopreno em *headspace* de culturas expressando sintase de isopreno kudzu, *idi*, e/ou *dxs* em diferentes números de cópias

Culturas de *E. coli* BL21 (λDE3) previamente transformadas com plasmídeos pTrcKudzu(kan) (A), pTrcKudzu-yIDI kan (B), pTrcKudzu-DXS kan (C), pTrcKudzu-yIDI-DXS kan (D) são crescidas em LB canamicina a 50 µg/mL. Culturas de pCL PtrcKudzu (E), pCL PtrcKudzu, pCL PtrcKudzu-yIDI (F) e pCL PtrcKudzu-DXS (G) são cultivadas em LB espectinomicina a 50 mcg/mL. As culturas são induzidas com 400 mM de IPTG em tempo de 0 (OD600 aproximadamente 0,5) e as amostras colhidas para mensuração *headspace* de isopreno (ver Exemplo 1). Os resultados são mostrados nas figuras 23A-23G.

Plasmídeo pTrcKudzu-yIDI-dxs (kan) foi introduzido em *E. coli* estirpe BL21 pela transformação. A tensão resultante BL21/pTrc Kudzu IDI DXS é cultivada durante a noite em LB contendo canamicina (50 mg/ml) a 20°C e utilizada para inocular frascos agitados de TM3 (13,6 g de K_2PO_4, 13,6 g de KH_2PO_4, 2,0 g de $MgSO_4*7H_2O$), 2,0 g de ácido cítrico monohidratado, 0,3 g de citrato de amônia férrico, 3,2 g de $(NH_4)_2SO_4$, 0,2 g de extrato de levedura, 1,0 ml de 1000x Solução para Traço Metal Modificada, ajustada ao pH 6,8 e q.s. para H_2O, e esterilizada por filtração) contendo glicose a 1%. Frascos são incubados a 30°C até uma OD600 de 0,8 ser atingida, e então induzida com 400 mM de IPTG. As amostras são colhidas em vários momentos após a indução e a quantidade de isopreno no *headspace* é medida conforme é descrito no Exemplo 1. Os resultados são mos-

trados na figura 23H.

III. Produção de isopreno a partir de biomassa em *E. coli*/pTrcKudzu yIDI DXS

A cepa BL21 pTrcKudzuIDIDXS é testada para a capacidade de geração de isopreno a partir de três tipos de biomassa, o bagaço, a palha de milho e polpa de madeira macia com a glicose como controle. Hidrolisados de biomassa são preparados por hidrólise enzimática (Brown, L e Torget, R., 1996, NREL padrão de ensaio método Lap-009 *"Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass"*) e utilizados na diluição com base em equivalentes de glicose. Neste exemplo, equivalentes de glicose é igual a 1% de glicose. Uma única colônia de uma placa de células recém-transformada de BL21 (DE3) pTrcKudzu yIDI DXS (kan) é usada para inocular 5 ml de LB mais canamicina (50 mg/ml). A cultura é incubada durante a noite a 25°C com agitação. No dia seguinte, a cultura de noite é diluída para uma OD_{600} de 0,05 em 25 ml de TM3 + 0,2% de YE + 1% de matéria-prima. A matéria-prima é o milho Stover bagaço, ou celulose de fibra longa. A glicose é usada como um controle positivo e nenhuma glicose é usada como controle negativo. As culturas são incubadas a 30°C com agitação a 180 rpm. A cultura é monitorada para OD_{600} e quando atinge uma OD_{600} de ~ 0,8, as culturas são analisadas nas 1º e 3 horas para a produção de isopreno, conforme descrito no Exemplo 1. Culturas não são induzidas. Todas as culturas com adição de matéria-prima produziram isoprenos equivalentes aos do controle da glicose positivo. Os experimentos são feitos em duplicada e são mostrados na figura 46.

IV. Produção de isopreno a partir de açúcar invertido em *E. coli*/ pTrcKudzu-IDIDXS

Uma única colônia de uma placa de células recém-transformadas de BL21(λDE3)/pTrcKudzu yIDI DXS (can) é usada para inocular 5 mL de LB + canamicina (50 µg/mL). A cultura é incubada durante a noite a 25°C com agitação. No dia seguinte, a cultura crescida durante a noite é diluída a uma OD_{600} de 0,05 em 25 mL de TM3 + 0,2% de YE + 1% de matéria-prima. Matéria-prima é glicose, glicose invertida ou palha de milho. A matéria-prima

de açúcar invertido (Danisco Invert Sugar) é preparada pelo tratamento enzimático de xarope de sacarose. A palha de milho AFEX é preparada como descrito abaixo (Parte V). As células são cultivadas a 30°C e a primeira amostra é medida quando as culturas atingem uma OD_{600} ~ 0,8-1,0 (0 hora). As culturas são analisadas pelo crescimento como medido pela OD_{600} e pela produção de isopreno como no Exemplo 1 nas horas 0, 1 e 3. Resultados são mostrados na figura 47.

V. Preparação de hidrolisado de palha de milho pré-tratada por AFEX

A palha de milho pré-tratada por AFEX é obtida no Instituto de Biotecnologia de Michigan. As condições de pré-tratamento são de 60% de umidade, carga de amônia 1:1 e 90°C por 30 minutos, em seguida, secagem ao ar. O teor de umidade na palha de milho pré-tratada por AFEX é de 21,27%. Os teores de glucana e xilana na palha de milho pré-tratada por AFEX são de 31,7% e 19,1% (base seca), respectivamente. O processo de sacarificação é o seguinte: 20 g de palha de milho pré-tratada por AFEX são adicionados em um frasco de 500 mL com 5 mL de tampão citrato de sódio a 1M pH 4,8, 2,25 mL de Accellerase 1000, 0,1 mL de Grindamyl H121 (produto de xilanase da Danisco de Aspergillus niger para a indústria de panificação) e 72,65 mL de água DI. O frasco é colocado em um agitador orbital e incubado a 50°C por 96 horas. Uma amostra é retirada do agitador e analisada por HPLC. O hidrolisado continha 38,5 g/L de glicose, 21,8 g/L de xilose e 10,3 g/L de oligômeros de glicose e/ou xilose.

VI. O efeito de extrato de levedura na produção de isopreno no crescimento de *E. coli* em cultura de batelada alimentada

A fermentação é realizada na escala de 14L como previamente descrito para células de *E. coli* contendo o plasmídeo pTrcKudzu yIDI DXS- descrito acima. O extrato de levedura (Bio Springer, Montreal, Quebec, Canada) é alimentado em taxa exponencial. A quantidade total de extrato de levedura distribuído ao fermentador varia entre 70-830 g durante a fermentação de 40 horas. A densidade ótica do caldo fermentativo é medida em um comprimento de onda de 550 nm. A densidade ótica final nos fermentadores é proporcional à quantidade de extrato de levedura adicionado (figura 48A).

O nível de isopreno no gás de escape do fermentador é determinado conforme descrito anteriormente. O título de isopreno aumenta ao longo da fermentação (figura 48B). A quantidade de isopreno produzida é linearmente proporcional à quantidade de extrato de levedura alimentada (figura 48C).

VII. Produção de isopreno em fermentação de 500L de pTrcKudzu DXS yIDI

Uma fermentação de 500 litros de células de *E. coli* com ácidos nucleicos de DXS de *E. coli,* IDI de *S. cerevisiae* e isopreno sintase de kudze (*E. coli* BL21(λDE3) pTrc Kudzu dxs yidi) é usada para produzir isopreno. Os níveis de isopreno variaram de 50 a 300 µg/L em um período de 15 horas. Com base nas concentrações médias de isopreno, o fluxo médio através do dispositivo e o grau de avanço de isopreno, a quantidade de isopreno coletado é calculada em cerca de 17 g.

VIII. Produção de isopreno em fermentação de 500 L de *E. coli* cultivada em cultura em batelada alimentada

Receita do Meio (por litro de meio de fermentação): 7,5g de K_2HPO_4, 2g de $MgSO_4 * 7H_2O$, 2g de ácido cítrico mono-hidratado, 0,3g de citrato de amônio férrico, 0,5g de extrato de levedura, 1 mL de Solução de Metal Traço Modificada 1000X. Todos os componentes são adicionados e dissolvidos em diH_2O. Esta solução é autoclavada. O pH é ajustado para 7,0 com gás de amônia (NH_3) e q.s. até o volume. Dez gramas de glicose, 0,1g de tiamina * HCl e antibiótico são adicionados após a esterilização e ajuste de pH.

Solução de Metal Traço Modificada 1000X: 40 g de ácido cítrico * H_2O, 30 g de $MnSO_4 * H_2O$, 10 g de NaCl, 1 g de $FeSO_4 * 7H_2O$, 1 g de $CoCl_2 * 6H_2O$, 1 g de $ZnSO_4 * 7H_2O$, 100 mg de $CuSO_4 * 5H_2O$, 100 mg de H_3BO_3, 100 mg de $NaMoO_4 * 2H_2O$. Os componentes são dissolvidos um por vez em H_2O DI, pH a 3,0 com HCl/NaOH, em seguida q.s. até o volume esterelizado por filtração em filtro de 0,22 mícrons.

A fermentação é realizada em um biorreator de 500L com células de *E. coli* contendo o plasmídeo pTrcKudzu yIDI DXS. Este experimento é realizado para monitorar a formação de isopreno a partir da glicose e extrato de levedura na temperatura de 30°C e pH 7,0 de fermentação deseja-

dos. Um inóculo de cepa de *E. coli* tirada de um frasco congelado é preparado em meio peptona de soja-extrato de levedura-glicose. Após o inóculo ser cultivado a OD 0,15, medida a 550 nm, 20 mL são usados para inocular um biorreator contendo 2,5 L de meio peptona de soja-extrato de levedura-glicose. O biorreator de 2,5 L é cultivado a 30°C até a OD 1,0 e 2,0 L são transferidos para o biorreator de 500 L.

Extrato de levedura (Bio Springer, Montreal, Quebec, Canada) e glicose são adicionados em taxas exponenciais. A quantidade total de glicose e extrato de levedura distribuída ao biorreator durante a fermentação de 50 horas é de 181,2 kg e 17,6 kg, respectivamente. A densidade ótica no biorreator ao longo do tempo é apresentada na figura 49A. O nível de isopreno no gás de escape do biorreator é determinado conforme descrito anteriormente. O título de isopreno aumenta ao longo da fermentação (figura 49B). A quantidade total de isopreno produzido durante a fermentação de 50 horas é de 55,1 g e a evolução da produção ao longo do tempo é apresentada na figura 49C.

Exemplo 8: Produção de isopreno em *E. coli* expressando genes da via do mevalonato recombinante e de isopreno sintase de kudzu

I. Clonagem da via inferior do MVA

A estratégia para clonagem da via inferior do mevalonato é como se segue. Quatro genes da via de biossíntese do mevalonato; genes de mevalonato quinase (MVK), fosfomevalonato quinase (PMK), difosfomevalonato descarboxilase (MVD) e difosfato de isopentenil isomerase são amplificados por PCR a partir do DNA cromossômico de *S. cerevisiae* e clonados individualmente no plasmídeo pCR BluntII TOPO (Invitrogen). Em alguns casos, o gene *idi* é amplificado a partir do DNA cromossômico de *E. coli*. Os iniciadores são desenhados tal que um RBS consenso de *E. coli* (AGGAGGT (SEQ ID Nº: 80) ou AAGGAGG (SEQ ID Nº: 81)) seja inserido na extremidade 5', 8 bp a montante do códon de início e um sítio *Pst*I seja adicionado na extremidade 3'. Os genes são em seguida clonados um por um no vetor pTrcHis2B até que a via inteira seja montada.

O DNA cromossômico de*S. cerevisiae* S288C é obtido na ATCC

(ATCC 204508D). O gene de MVK é amplificado a partir do cromossoma de *S. cerevisiae* usando os iniciadores MVKF (5'-AGGAGGTAAAAAAACATGT CATTACCGTTCTTAACTTCTGC, SEQ ID Nº: 21) e MVK-Pst1-R (5'-ATGG CTGCAGGCCTATCGCAAATTAGCTTATGAAGTCCATGGTAAATTCGTG, SEQ ID Nº: 22) usando PfuTurbo de acordo com as instruções do fabricante. O produto de PCR do tamanho correto (1370 bp) é identificado por eletroforese através de um E-gel de 1,2% (Invitrogen) e clonado em pZeroBLUNT TOPO. O plasmídeo resultante é designado pMVK1. O plasmídeo pMVK1 é digerido com as endonucleases de restrição *Sac*I e *Taq*1 e o fragmento é purificado do gel e ligado no pTrcHis2B digerido com *Sac*I e *Bst*BI. O plasmídeo resultante é nomeado pTrcMVK1.

O segundo gene na via de biossíntese do mevalonato, PMK, é amplificado por PCR usando os iniciadores: PstI-PMK1 R (5'-GAATTCGCC CTTCTGCAGCTACC, SEQ ID Nº: 23) e BsiHKA I-PMK1 F (5'-CGACTGGT GCACCCTTAAGGAGGAAAAAAACATGTCAG, SEQ ID Nº: 24). A reação de PCR é realizada usando a Pfu Turbo polimerase (Stratagene) de acordo com as instruções do fabricante. O produto de tamanho correto (1387 bp) é digerido com *Pst*I e *Bsi*HKI e ligado no pTrcMVK1 digerido com *Pst*I. O plasmídeo resultante é nomeado pTrcKK. Os genes de MVD e *idi* são clonados da mesma maneira. A PCR é executada usando os pares de iniciadores PstI-MVD 1 R (5'-GTGCTGGAATTCGCCCTTCTGCAGC, SEQ ID Nº: 25) e NsiI-MVD 1 F (5'-GTAGATGCATGCAGAATTCGCCCTTAAGGAGG, SEQ ID Nº: 26) para amplificar o gene de MVD e PstI-YIDI 1 R (5'-CCTTCTGCAGGAC GCGTTGTTATAGC, SEQ ID Nº: 27) e NsiI-YIDI 1 F (5'-CATCAATGCATC GCCCTTAGGAGGTAAAAAAAAATGAC, SEQ ID Nº: 28) para amplificar o gene de yIDI. Em alguns casos, o gene da IPP isomerase, *idi* de *E. coli* é utilizado. Para amplificar *idi* a partir do DNA cromossômico de *E. coli*, o seguinte conjunto de iniciadores é utilizado: PstI-CIDI 1 R (5'-GTGTGATGGA TATCTGCAGAATTCG, SEQ ID Nº: 29) eNsiI-CIDI 1 F (5'-CATCAATGCATC GCCCTTAGGAGGTAAAAAAACATG, SEQ ID Nº: 30). O DNA molde é DNA cromossômico isolado por métodos padrão a partir de *E. coli* FM5 (WO 96/35796 e WO 2004/033646, que são aqui incorporados, cada um, como

referência em suas totalidades, particularmente em relação ao isolamento de ácidos nucleicos). Os plasmídeos finais são nomeados pKKDIy para a construção que codifica o gene *idi* de levedura ou pKKDIc para a construção que codifica o gene *idi* de *E. coli*. Os plasmídeos são transformados em hospedeiros de *E. coli* BL21 para análise subsequente. Em alguns casos, a isopreno sintase de kudzu é clonada em pKKDIy produzindo o plasmídeo pKKDIyIS.

A via inferior do MVA também é clonada em pTrc contendo um marcador de resistência ao antibiótico canamicina. O plasmídeo pTrcKKDIy é digerido com as endonucleases de restrição *Apa*I e *Pst*I, o fragmento de 5930 bp é separado em um E-gel de agarose a 1,2% e purificado usando o kit Gel Purification da Qiagen de acordo com as instruções do fabricante. O plasmídeo pTrcKudzuKan, descrito no Exemplo 7, é digerido com as endonucleases de restrição *Apa*I e *Pst*I, e o fragmento de 3338 bp contendo o vetor é purificado a partir de um E-gel de 1,2% usando o kit Gel Purification da Qiagen. O fragmento de vetor de 3338 bp e o fragmento da via inferior do MVA de 5930 bp são ligados usando o Kit Quick Ligation da Roche. A mistura de ligação é transformada em células de *E. coli* TOP10 e transformantes foram cultivados a 37°C durante a noite com seleção em LA contendo canamicina (50 µg/mL). Os transformantes são verificados por digestão com enzima de restrição e um é congelado como estoque. O plasmídeo é designado pTrcKanKKDIy.

II. Clonagem de um gene de isopreno sintase de kudzu em pTrcKanKKDIy

O gene de isopreno sintase de kudzu é amplificado por PCR a partir de pTrcKudzu, descrito no Exemplo 1, usando os iniciadores MCM50 5'-GATCATGCATTCGCCCTTAGGAGGTAAAAAAACATGTGTCGACCT CTTCTCAATTTACT (SEQ ID Nº: 31) e MCM53 5'- CGGTCGACGGATCC CTGCAGTTAGACATACATCAGCTG (SEQ ID Nº: 32). O fragmento de PCR resultante é clonado em pCR2.1 e transformado em *E. coli* TOP10. Este fragmento contém a sequência codificante da isopreno sintase de kudzu e uma região a montante contendo um RBS de *E. coli*. Transformantes são incubados durante a noite a 37° C com seleção em LA contendo carbenicili-

na (50 µg/mL). A correta inserção do fragmento é verificada por sequenciamento e esta cepa é designada como MCM93.

O plasmídeo da cepa MCM93 é digerido com as endonucleases de restrição *Nsi*I e *Pst*I para liberar um inserto de 1724 bp contendo o RBS e a isopreno sintase de kudzu. O fragmento de 1724 bp é separado em um E-gel de agarose a 1,2% e purificado usando o kit Gel Purification da Qiagen de acordo com as instruções do fabricante. O plasmídeo pTrcKanKKDIy é digerido com a endonuclease de restrição *Pst*I, tratado com SAP por 30 minutos a 37°C e purificado usando o kit de purificação de produto de PCR da Qiagen. O plasmídeo e o fragmento de DNA codificando a isopreno sintase de kudzu são ligados usando o Kit Quick Ligation da Roche. A mistura de ligação é transformada em células de *E. coli* TOP10 e transformantes são cultivados durante a noite a 37°C com seleção em LA contendo canamicina a 50 µg/mL. O transformante correto é verificado por digestão de restrição e o plasmídeo é designado pTrcKKDyIkISKan (figuras 24 e 25). Este plasmídeo é transformado em células BL21(λDE3) (Invitrogen).

III. Produção de isopreno a partir de mevalonato em *E. coli* expressando a via inferior recombinante do mevalonato e isopreno sintase de kudzu.

A cepa BL21/pTrcKKDyIkISKan é cultivada em meio MOPS (Neidhardt *et al.*, (1974) *J. Bacteriology* 119:736-747) ajustado a pH 7,1 e suplementado com 0,5% de glicose e 0,5% de ácido mevalônico. Uma cultura controle também é estabelecida usando condições idênticas, mas sem a adição de 0,5% de ácido mevalônico. A cultura é iniciada a partir de uma cultura semeada durante a noite com um inóculo de 1% e induzida com 500 µM de IPTG quando a cultura atingisse uma OD_{600} de 0,3 a 0,5. As culturas são cultivadas a 30°C com agitação a 250 rpm. A produção de isopreno é analisada 3 horas após a indução com o ensaio *headspace* descrito no Exemplo 1. A produção máxima de isopreno é 6,67 x 10^{-4} mol/L_{caldo}/OD_{600}/h onde L_{caldo} é o volume do caldo e inclui tanto o volume do meio celular como o volume das células. A cultura controle não suplementada com ácido mevalônico não produz isopreno mensurável.

IV. Clonagem da via superior do MVA

A via biossintética superior do mevalonato, compreendendo dois genes que codificam três atividades enzimáticas, é clonada a partir de *Enterococcus faecalis*. O gene *mvaE* codifica uma proteína com as atividades enzimáticas tanto de acetil-CoA acetiltransferase como de 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) redutase, as primeira e terceira proteínas da via e o gene *mvaS* codifica a segunda enzima da via, HMG-CoA sintase. O gene *mvaE* é amplificado a partir do DNA genômico de *E. faecalis* (ATCC 700802D-5) com um sítio de ligação ribossomal de *E. coli* e um espaçador na frente usando os seguintes iniciadores:

CF 07-60 (+) Início de *mvaE* w/ RBS + códon de início ATG *Sac*I

5' – GAGACATGAGCTCAGGAGGTAAAAAAACATGAAAACA GTAGTTATTATTG (SEQ ID Nº: 34)

CF 07-62 (-) Fundir *mvaE* a *mvaS* com RBS no meio

5' – TTTATCAATCCCAATTGTCATGTTTTTTTACCTCCTTTA TTGTTTTCTTAAATC (SEQ ID Nº: 35)

O gene *mvaS* é amplificado a partir do DNA genômico de *E. faecalis* (ATCC 700802D-5) com um RBS e espaçador de *E. coli* na frente usando os seguintes iniciadores:

CF 07-61 (+) Fundir *mvaE* a *mvaS* com RBS no meio

5' - GATTTAAGAAAACAATAAAGGAGGTAAAAAAACATGACA-ATT GGGATTGATAAA (SEQ ID Nº: 36)

CF 07-102 (-) Final do gene *mvaS Bgl*II

5' -GACATGACATAGATCTTTAGTTTCGATAAGAACGAACGGT (SEQ ID Nº: 37)

Os fragmentos de PCR são fusionados, com a PCR usando os seguintes iniciadores:

CF 07-60 (+) Início de *mvaE* w/ RBS + códon de início ATG *Sac*I

5'-GAGACATGAGCTCAGGAGGTAAAAAAACATGAAAACAGTAGTTATTAT TG (SEQ ID Nº: 34)

CF 07-102 (-) Final do gene *mvaS Bgl*II

5'-GACATGACATAGATCTTTAGTTTCGATAAGAACGAACGGT (SEQ ID Nº: 37)

O fragmento de fusão de PCR é purificado usando um kit Qiagen e digerido com as enzimas de restrição *Sac*I e *Bgl*II. Este fragmento de DNA digerido é purificado do gel usando um kit Qiagen e ligado no vetor disponível comercialmente pTrcHis2A, que foi digerido com *Sac*I e *Bgl*II e purificado do gel.

A mistura de ligação é transformada em células *E. coli* Top 10 e colônias são selecionadas em placas de LA+50 µg/mL de carbenicilina. Um total de seis colônias é escolhido e cultivado durante a noite em LB+50 µg/mL de carbenicilina e plasmídeos são isolados usando um kit Qiagen. Os plasmídeos são digeridos com *Sac*I e *Bgl*II para checar os insertos e um plasmídeo correto é sequenciaco com os seguintes iniciadores:

CF 07-58 (+) Início do gene *mvaE*

5' – ATGAAAACAGTAGTTATTATTGATGC (SEQ ID Nº: 38)

CF 07-59 (-) Final do gene *mvaE*

5' – ATGTTATTGTTTTCTTAAATCATTTAAAATAGC (SEQ ID Nº: 39)

CF 07-82 (+) Início do gene *mvaS*

5' – ATGACAATTGGGATTGATAAAATTAG (SEQ ID Nº: 40)

CF 07-83 (-) Final do gene *mvaS*

5' – TTAGTTTCGATAAGAACGAACGGT (SEQ ID Nº: 41)

CF 07-86 (+) Sequência em *mvaE*

5' – GAAATAGCCCCATTAGAAGTATC (SEQ ID Nº: 42)

CF 07-87 (+) Sequência em *mvaE*

5' – TTGCCAATCATATGATTGAAAATC (SEQ ID Nº: 43)

CF 07-88 (+) Sequência em *mvaE*

5' – GCTATGCTTCATTAGATCCTTATCG (SEQ ID Nº: 44)

CF 07-89 (+)Sequência *mvaS*

5' – GAAACCTACATCCAATCTTTTGCCC (SEQ ID Nº: 45)

O plasmídeo chamado pTrcHis2AUpperPathway#1 está correto pelo sequenciamento e é transformado na epa BL21 de *E. coli* disponível

comercialmente. A seleção é feita em LA+ 50 µg/mL de carbenicilina. Dois transformantes são escolhidos e cultivados em LB+ 50 µg/mL de carbenicilina até que eles atinjam uma OD_{600} de 1,5. Ambas as cepas são congeladas em um recipiente a -80°C na presença de glicerol. Cepas são designadas como CF 449 para pTrcHis2AUpperPathway#1 em BL21, isolado #1 e CF 450 para pTrcHis2AUpperPathway#1 em BL21, isolado #2. Descobriu-se que ambos os clones são se comportam identicamente quandos analisados.

V. Clonagem da Via Superior do MVA em pCL1920

O plasmídeo pTrcHis2AUpperPathway é digerido com a endonuclease de restrição *Ssp*I para liberar um fragmento contendo pTrc-*mvaE*-*mvaS*-(His tag)-terminator. Neste fragmento, a cauda de His não é traduzida. Este fragmento de 4,5 kbp de extremidades cegas é purificado a partir de um E-gel de 1,2% usando o kit Gel Purification da Qiagen. Um fragmento de 4,2 kbp defosforilado, com extremidades cegas de pCL1920 é preparado por digestão do vetor com a endonuclease de restrição *Pvu*II, tratamento com SAP e purificação do gel a partir de um E-gel de 1,2% usando o kit Gel Purification da Qiagen. Os dois fragmentos são ligados usando o Kit Quick Ligation da Roche e transformados em células químicamente competentes TOP10. Transformantes são selecionados em LA contendo espectinomicina (50 µg/mL). Uma colônia correta é identificada pela triagem pela presença do inserto por PCR. O plasmídeo é designado pCL PtrcUpperPathway (figuras 26 e 27A-27D).

VI. Cepas Expressando as Vias Superior e Inferior do Mevalonato Combinadas

Para obter uma cepa com via do mevalonato completa mais isopreno sintase de kudzu, plasmídeos pTrcKKDyIkISkan e pCLpTrcUpperPathway são ambos transformados em células competentes BL21(λDE3) (Invitrogen) e transformantes são selecionados em LA contendo canamicina (50 µg/mL) e espectinomicina (50 µg/mL). Os transformantes são checados por prep. de plasmídeo para garantir que ambos os plasmídeos estejam retidos no hospedeiro. A cepa é designada MCM127.

VII. Produção de ácido mevalônico a partir de glicose em *E. coli* pUpperpa-

thway

Colônias isoladas de BL21/pTrcHis2A-*mvaE/mvaS* ou FM5/p pTrcHis2A-*mvaE/mvaS* são inoculadas em LB + carbenicilina (100 µg/mL) e são cultivadas durante a noite a 37°C com agitação a 200 rpm. Essas culturas são diluídas em 50 mL de meio em frascos aletados de 250 mL para uma OD_{600} de 0,1. O meio é TM3 + 1 ou 2% de glicose + carbenicilina (100 ug/mL) ou TM3 + 1% de glicose + óleo de soja hidrolisado + carbenicilina (100 ug/mL) ou TM3 + biomassa (painço (*switchgrass*), palha de milho ou bagaço preparado). Culturas são cultivadas a 30°C com agitação a 200 rpm por aproximadamente 2-3 horas até uma OD_{600} de 0,4 ser atingida. Neste momento a expressão da construção *mvaE mvaS* é induzida pela adição de IPTG (400 µM). Culturas são incubadas por 20 ou 40 horas adicionais com amostras sendo tomadas em intervalos de 2 horas a 6 horas após a indução e em seguida em 24, 36 e 48 horas conforme necessário. A amostragem é feita pela remoção de 1 mL de cultura, medição da OD_{600}, sedimentação das células em uma *Microfuge*, remoção do sobrenadante e análise do mesmo para ácido mevalônico.

Uma fermentação de 14 litros de células de *E. coli* com ácidos nucleicos que codificam polipeptídeos de HMG-CoA redutase, HMG-CoA sintase e AA-CoA tiolase de *Enterococcus faecalis* produz 22 gramas de ácido mevalônico com meio TM3 e 2% de glicose como o meio celular. Um frasco em agitação dessas células produz 2-4 gramas de ácido mevalônico por litro com meio LB e 1% de glicose como o meio de cultura de células. A produção de ácido mevalônico nessas cepas indica que a via do MVA era funcional em *E. coli*.

VIII. Produção de isopreno em *E. coli* BL21 contendo as vias superior e inferior do MVA mais isopreno sintase de kudzu.

As seguintes cepas são criadas por transformação em várias combinações de plasmídeos contendo o gene da isopreno sintase de kudzu e da via superior e inferior do MVA, como descrito acima e os plasmídeos contendo os genes *idi*, *dxs*, *dxr* e de isopreno sintase descritos no Exemplo 7. As células hospedeiras usadas são BL21(λDE3) quimicamente competen-

tes e as transformações são feitas por métodos padrão. Transformantes são selecionados em L ágar contendo canamicina (50 µg/mL) ou canamicina mais espectinomicina (ambas em uma concentração de 50 µg/mL). Placas foram cultivadas a 37°C. As cepas resultantes são designadas como se segue:

Cultivadas em canamicina mais espectinomicina (50 µg/mL cada)

MCM127 - pCL Upper MVA + pTrcKKDyIkIS (kan) em BL21(λDE3)

MCM131 - pCL1920 + pTrcKKDyIkIS (kan) em BL21(λDE3)

MCM125 - pCL Upper MVA + pTrcHis2B (kan) em BL21(λDE3)

Cultivadas em canamicina (50 µg/mL)

MCM64 - pTrcKudzu yIDI DXS (kan) em BL21(λDE3)

MCM50 - pTrcKudzu (kan) em BL21(λDE3)

MCM123 - pTrcKudzu yIDI DXS DXR (kan) em BL21(λDE3)

As cepas acima são inoculadas a partir de estoques congelados para LA + antibiótico apropriado e cultivadas durante a noite a 37°C. Uma única colônia de cada placa é usada para inocular frascos de agitação (25 mL de LB + o antibiótico apropriado). Os frascos são incubados a 22°C durante a noite com agitação a 200 rpm. Na manhã seguinte os frascos são transferidos para uma incubadora a 37°C e cultivados por 4,5 horas adicionais com agitação a 200 rpm. As culturas de 25 mL são centrifugadas para sedimentar as células e estas são ressuspendidas em 5 mL de LB + o antibiótico apropriado. As culturas são em seguida diluídas em 25 mL de LB+1% de glicose + o antibiótico apropriado para uma OD_{600} de 0,1. São preparados dois frascos para cada cepa, um para indução com IPTG (800 µM), o segundo não é induzido. As culturas são incubadas a 37°C com agitação a 250 rpm. Um grupo das culturas é induzido após 1,50 horas (imediatamente após o tempo 1 de amostragem). Em cada tempo de amostragem, a OD_{600} é medida e a quantidade de isopreno determinada conforme descrito no Exemplo 1. Os resultados são apresentados na Tabela 3. A quantidade de isopreno feito é apresentada como a quantidade do pico de produção para a cepa particular.

Tabela 3. Produção de isopreno em cepas de *E. coli*

Cepa	Isopreno (µg/litro/OD/h)
MCM50	23,8
MCM64	289
MCM125	ND
MCM131	Traço
MCM127	874

ND: não detectado

Traço: pico presente, mas não integrável.

IX. Análise de ácido mevalônico

A mevalonolactona (1,0 g, 7,7 mmols) (CAS# 503-48-0) é fornecida pela Sigma-Aldrich (WI, USA) como um xarope que é dissolvido em água (7,7 mL) e e é tratada com hidróxido de potássio (7,7 mmols) a fim de gerar o sal de potássio do ácido mevalônico. A conversão em ácido mevalônico é confirmada por análise de ^{1}H RMN. Amostras para análise de HPLC são preparadas pela centrifugação a 14.000 rpm por 5 minutos para remover células, seguida pela adição de uma alíquota de 300 µL de sobrenadante a 900 µL de H_2O. Em seguida, é adicionado ácido perclórico (36 µL de uma solução a 70%) seguido pela mistura e resfriamento em gelo por 5 minutos. As amostras são em seguida centrifugadas novamente (14.000 rpm por 5 min) e o sobrenadante transferido para HPLC. Padrões de ácido mevalônico (20, 10, 5, 1 e 0,5 g/L) são preparados da mesma maneira. A análise de ácido mevalônico (volume de injeção de 20 uL) é realizada por HPLC usando uma coluna BioRad Aminex 87-H+ (300 mm por 7,0 mm) eluída com 5 mM de ácido sulfúrico a 0,6 mL/min com detecção do índice de refração (IR). Sob estas condições, o ácido mevalônico é eluído na forma de lactona em 18,5 minutos.

X. Produção de isopreno em *E. coli* BL21 contendo a via superior do MVA mais isopreno sintase de kudzu

Uma fermentação na escala de 15 L de *E. coli* expressando polipeptídeos da via do mevalonato e isopreno sintase de kudzu é usada para produzir isopreno em células em cultura de batelada alimentada. Este expe-

rimento demonstra que células em cultivo sob condições de limitação de glicose resultam na produção de 2,2 g/L de isopreno.

Receita do meio (por litro de meio de fermentação): O meio é gerado usando os seguintes componentes por litro de meio de fermentação: 7,5g de K_2HPO_4, 2g de $MgSO_4 * 7H_2O$, 2g de ácido cítrico mono-hidratado, 0,3g de citrato de amônio férrico, 0,5g de extrato de levedura e 1 mL de solução de metal traço modificada 1000X. Todos os componentes são adicionados e dissolvidos em diH_2O. Esta solução é autoclavada. O pH é ajustado para 7,0 com hidróxido de amônio (30%) e q.s. até o volume. Dez gramas de glicose, 0,1g de tiamina * HCl e antibióticos são adicionados após a esterilização e ajuste de pH.

Solução de Metal Traço Modificada 1000X: a solução de metal traço modificada 1000X é gerada usando os seguintes componentes: 40 g de ácido cítrico * H_2O, 30 g de $MnSO_4 * H_2O$, 10 g de NaCl, 1 g de $FeSO_4 * 7H_2O$, 1 g de $CoCl_2 * 6H_2O$, 1 g de $ZnSO_4 * 7H_2O$, 100 mg de $CuSO_4 * 5H_2O$, 100 mg de H_3BO_3, 100 mg de $NaMoO_4 * 2H_2O$. Os componentes são dissolvidos um por vez em diH_2O, pH a 3,0 com HCl/NaOH, em seguida q.s. até o volume esterilizado por filtração em filtro de 0,22 mícrons.

A fermentação é realizada em um biorreator de 15 L com células de *E. coli* BL21(DE3) contendo os plasmídeos pCL PtrcUpperPathway (figura 26) e pTrcKKDyIkIS. Este experimento é realizado para monitorar a formação de isopreno a partir da glicose na temperatura de 30°C e pH 7,0 de fermentação desejados. Um inóculo de cepa de *E. coli* tirado de um recipiente congelado é estriado em uma placa de LB ágar (com antibióticos) e incubado a 37°C. Uma única colônia é inoculada em meio de peptona de soja-extrato de levedura-glicose. Após o inóculo ser cultivado até a OD de 1,0, quando medida a 550 nm, 500 mL são usados para inocular um biorreator de 15 L contendo um volume de trabalho inicial de 5 L.

A glicose é adicionada em taxa exponencial até que as células atinjam a fase estacionária. Após este momento, a alimentação de glicose é diminuída para atender demandas metabólicas. A quantidade total de glicose distribuída ao biorreator durante a fermentação de 54 horas é de 3,7 kg. A

indução é feita pela adição de isopropil-beta-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG). A concentração de IPTG é levada a 25 uM quando a densidade ótica a 550 nm (OD_{550}) atinge um valor de 10. A concentração de IPTG é elevada a 50 uM quando a OD_{550} atinge 190. A concentração de IPTG é elevada a 100 uM em 38 horas de fermentação. O perfil da OD_{550} no biorreator ao longo do tempo é apresentado na figura 54. O nível de isopreno no gás de escape do biorreator é determinado conforme aqui descrito. O título de isopreno aumenta ao longo da fermentação até um volume final de 2,2 g/L (figura 55). A quantidade total de isopreno produzida durante a fermentação de 54 horas é de 15,9 g e a evolução da produção ao longo do tempo é apresentada na figura 56.

XI. Fermentação de isopreno em *E. coli* expressando genes da via do mevalonato e cultivada em cultura de batelada alimentada na escala de 15 L

Uma fermentação na escala de 15 L de *E. coli* expressando polipeptídeos da via do mevalonato e isopreno sintase de kudzu é usada para produzir isopreno em células em cultura de batelada alimentada. Este experimento demonstra que células em cultivo sob condições de limitação de glicose resultam na produção de 3,0 g/L de isopreno.

Receita do meio (por litro de meio de fermentação): O meio é gerado usando os seguintes componentes por litro de meio de fermentação: 7,5g de K_2HPO_4, 2g de $MgSO_4 * 7H_2O$, 2g de ácido cítrico mono-hidratado, 0,3g de citrato de amônio férrico, 0,5g de extrato de levedura e 1 mL de solução de metal traço modificada 1000X. Todos os componentes são adicionados e dissolvidos em diH_2O. Esta solução é autoclavada. O pH é ajustado para 7,0 com hidróxido de amônio (30%) e q.s. até o volume. Dez gramas de glicose, 0,1g de tiamina * HCl e antibióticos são adicionados após a esterilização e ajuste de pH.

Solução de Metal Traço Modificada 1000X: a solução de metal traço modificada 1000X é gerada usando os seguintes componentes: 40 g de ácido cítrico * H_2O, 30 g de $MnSO_4 * H_2O$, 10 g de NaCl, 1 g de $FeSO_4 * 7H_2O$, 1 g de $CoCl_2 * 6H_2O$, 1 g de $ZnSO_4 * 7H_2O$, 100 mg de $CuSO_4 * 5H_2O$, 100 mg de H_3BO_3, 100 mg de $NaMoO_4 * 2H_2O$. Os componentes são dissol-

vidos um por vez em diH_2O, pH a 3,0 com HCl/NaOH, em seguida q.s. até o volume esterilizado por filtração em filtro de 0,22 mícrons.

A fermentação é realizada em um biorreator de 15 L com células de *E. coli* BL21(DE3) contendo os plasmídeos pCL PtrcUpperMVA e pTrc KKDyIkIS. Este experimento é realizado para monitorar a formação de glicose na temperatura de 30°C e pH 7,0 de fermentação desejados. Um inóculo de cepa de *E. coli* tirado de um recipiente congelado é estriado em uma placa de LB ágar (com antibióticos) e incubado a 37°C. Uma única colônia é inoculada em meio de triptona-extrato de levedura. Após o inóculo ser cultivado até a OD de 1,0, medida a 550 nm, 500 mL são usados para inocular um biorreator de 15 L contendo um volume de trabalho inicial de 5 L.

A glicose é adicionada em taxa exponencial até que as células atinjam a fase estacionária. Após este momento, a alimentação de glicose é diminuída para atender demandas metabólicas. A quantidade total de glicose distribuída ao biorreator durante a fermentação de 59 horas é de 2,2 kg. A indução é feita pela adição de IPTG. A concentração de IPTG é levada a 25 uM quando a densidade ótica a 550 nm (OD_{550}) atinge um valor de 10. A concentração de IPTG é elevada a 50 uM quando a OD_{550} atinge 190. O perfil da OD_{550} no biorreator ao longo do tempo é apresentado na figura 93. O nível de isopreno no gás de escape do biorreator é determinado conforme aqui descrito. O título de isopreno aumenta ao longo da fermentação até um valor final de 3,0 g/L (figura 94). A quantidade total de isopreno produzida durante a fermentação de 59 horas é de 22,8 g e a evolução da produção ao longo do tempo é apresentada na FIGURA 95. O rendimento molar do carbono utilizado que entra na produção de isopreno durante a fermentação é de 2,2%. O rendimento em porcentagem de peso de isopreno a partir da glicose é de 1,0%.

XII. Fermentação de isopreno em *E. coli* expressando genes da via do mevalonato e cultivada em cultura de batelada alimentada na escala de 15 L

Uma fermentação na escala de 15 L de *E. coli* expressando polipeptídeos da via do mevalonato, isopreno sintase de *Pueraria lobata* e isopreno sintase de kudzu é usada para produzir isopreno em células em cultu-

ra de batelada alimentada. Este experimento demonstra que células em cultivo sob condições de limitação de glicose resultam na produção de 3,3 g/L de isopreno.

i) Construção de pCLPtrcUpperPathwayHGS2

O gene que codifica a isopreno sintase de *Pueraria lobata* é amplificado por PCR usando os iniciadores NsiI-RBS-HGS F (CTTGATGCATCCTGCATTCGCCCTTAGGAGG, SEQ ID Nº: 88) e pTrcR (CCAGGCAAATTCTGTTTTATCAG, SEQ ID Nº: 89), e pTrcKKDyIkIS como o molde. O produto de PCR assim obtido é digerido por restrição com *Nsi*I e *Pst*I e purificado em gel. O plasmídeo pCL PtrcUpperPathway é digerido por restrição com *Pst*I e defosforilado usando a fosfatase alcalina rAPid (Roche) de acordo com as instruções do fabricante.

Esses fragmentos de DNA são ligados e a reação de ligação é transformada em células quimicamente competentes de *E. coli* Top10 (Invitrogen), plaqueadas em L ágar contendo espectinomicina (50 µg/ml) e incubadas durante a noite a 37°C. O DNA plasmidial é preparado a partir de 6 clones usando o kit de minipreparação Qiaquick Spin. O DNA plasmidial é digerido com as enzimas de restrição *Eco*RV e *Mlu*I para identificar um clone em que o inserto tenha a orientação certa (ou seja, o gene orientado da mesma forma que o promotor pTrc).

O plasmídeo correto resultante é designado pCLPtrcUpperPathwayHGS2. Este plasmídeo é avaliado usando o ensaio *headspace* aqui descrito e descobriu-se que produz isopreno em *E. coli* Top10, validando assim a funcionalidade do gene. O plasmídeo é transformado em BL21(λDE3) contendo pTrcKKDyIkIS para produzir a cepa BL21/ pCLPtrcUpperPathwayHGS2-pTrcKKDyIkIS. Esta cepa tem uma cópia extra da isopreno sintase comparada com a cepa BL21/pCL PtrcUpperMVA e pTrc KKDyIkIS (Exemplo 8, parte XI). Esta cepa também tem maiores expressão e atividade de HMGS comparada com a cepa BL21/pCL PtrcUpperMVA e pTrc KKDyIkIS usada no Exemplo 8, parte XI.

ii) Fermentação de isopreno em *E. coli* expressando pCLPtrcUpperPathwayHGS2-pTrcKKDyIkIS e cultivada em cultura de batelada alimentada na es-

cala de 15 L

Receita do meio (por litro de meio de fermentação): O meio é gerado usando os seguintes componentes por litro de meio de fermentação: 7,5g de K_2HPO_4, 2g de $MgSO_4 * 7H_2O$, 2g de ácido cítrico mono-hidratado, 0,3g de citrato de amônio férrico, 0,5g de extrato de levedura e 1 mL de solução de metal traço modificada 1000X. Todos os componentes são adicionados e dissolvidos em diH_2O. Esta solução é autoclavada. O pH é ajustado para 7,0 com hidróxido de amônio (30%) e q.s. até o volume. Dez gramas de glicose, 0,1g de tiamina * HCl e antibióticos são adicionados após a esterilização e ajuste de pH.

Solução de Metal Traço Modificada 1000X: a solução de metal traço modificada 1000X é gerada usando os seguintes componentes: 40 g de ácido cítrico * H_2O, 30 g de $MnSO_4 * H_2O$, 10 g de NaCl, 1 g de $FeSO_4 * 7H_2O$, 1 g de $CoCl_2 * 6H_2O$, 1 g de $ZnSO_4 * 7H_2O$, 100 mg de $CuSO_4 * 5H_2O$, 100 mg de H_3BO_3, 100 mg de $NaMoO_4 * 2H_2O$. Os componentes são dissolvidos um por vez em Di H_2O, pH a 3,0 com HCl/NaOH, em seguida q.s. até o volume esterilizado por filtração em filtro de 0,22 mícrons.

A fermentação é realizada em um biorreator de 15 L com células de *E. coli* BL21(DE3) contendo os plasmídeos pCLPtrcUpperPathwayHGS2 e pTrc KKDyIkIS. Este experimento é realizado para monitorar a formação de isopreno a partir de glicose na temperatura de 30°C e pH 7,0 de fermentação desejados. Um inóculo de cepa de *E. coli* tirado de um recipiente congelado é estriado em uma placa de LB ágar (com antibióticos) e incubado a 37°C. Uma única colônia é inoculada em meio de triptona-extrato de levedura. Após o inóculo ser cultivado até a OD de 1,0, medida a 550 nm, 500 mL são usados para inocular um biorreator de 15 L contendo um volume de trabalho inicial de 5 L.

A glicose é adicionada em taxa exponencial até que as células atinjam a fase estacionária. Após este momento, a alimentação de glicose é diminuída para atender demandas metabólicas. A quantidade total de glicose distribuída ao biorreator durante a fermentação de 58 horas é de 2,1 kg. A indução é feita pela adição de IPTG. A concentração de IPTG é levada a 25

uM quando a densidade ótica a 550 nm (OD_{550}) atinge um valor de 9. A concentração de IPTG é elevada a 50 uM quando a OD_{550} atinge 170. O perfil da OD_{550} no biorreator ao longo do tempo é apresentado na figura 104. O nível de isopreno no gás de escape do biorreator é determinado conforme aqui descrito. O título de isopreno aumenta ao longo da fermentação até um valor final de 3,3 g/L (figura 105). A quantidade total de isopreno produzido durante a fermentação de 58 horas é de 24,5 g e a evolução da produção ao longo do tempo é apresentada na figura 106. O rendimento molar do carbono utilizado que entra na produção de isopreno durante a fermentação é de 2,5%. O rendimento em porcentagem de peso de isopreno a partir da glicose é de 1,2%. A análise mostra que a atividade da isopreno sintase é aumentada aproximadamente 3-4 vezes comparada com BL21 expressando os plasmídeos CL PtrcUpperMVA e pTrc KKDyIkIS (dados não mostrados).

XIII. Integração cromossômica da via inferior do mevalonato em *E. coli.*

Um operon sintético contendo mevalonato quinase, mevalonato fosfato quinase, mevalonato pirofosfato descarboxilase e a IPP isomerase é integrado ao cromossoma de *E. coli.* Se desejado, a expressão pode ser alterada pela integração de diferentes promotores 5' do operon.

A Tabela 9 lista os iniciadores usados para este experimento.

Tabela 9. Iniciadores

MCM78	attTn7 up rev para a construção de integração	gcatgctcgagcggccgcTTTTAATCAAA-CATCCTGCCAACTC (SEQ ID Nº: 91)
MCM79	attTn7 down rev para a construção de integração)	gatcgaagggcgatcgTGTCACAGTCTGGC-GAAACCG (SEQ ID Nº: 92)
MCM88	attTn7 up forw para a construção de integração	ctgaattctgcagatatcTGTTTTTC-CACTCTTCGTTCACTTT (SEQ ID Nº: 93)
MCM89	attTn7 down forw para a construção de integração	tctagagggcccAAGAAAAATGCCCCGCT-TACG (SEQ ID Nº: 94)
MCM104	promotor GI1.2 – MVK	Gatcgcggccgcgcccttgacgatgc-acatcctgagcaaataattcaaccac-aattgtgagcggataacacaaggagg-aacagctatgtcattaccgttcttaacttc (SEQ ID Nº: 95)

MCM105	terminador aspA – yIDI	Gatcgggccccaagaaaaaaggcacg-catctgacgtgccttttttatttgta-acgcgttgttatagcattcta (SEQ ID Nº: 96)
MCM120	forw de attTn7: homologia com attTn7, homologia com marcador GB	aaagtagccgaagatgacggtttgtc-catggagttggcaggatgtttgatta-aagcAATTAACCCTCACTAAAGGGCGG (SEQ ID Nº: 97)
MCM127	Rev complement de 1.2 GI: homologia com marcador GB (extralongo), promotor, RBS, ATG	AGAGTGTTCACCAAAAATAATAACCTTT CCCGGTGCAgaagttaagaacggtaa-gacatagctgtttcctccttgtgtta-ccgctcacaattagtggttgaattat-tgctcaggatgtggcatcgtcaaggg-TAATACGACTCACTATAGGGCTCG (SEQ ID Nº: 98)

i) Construção de vetor-alvo

O sítio attTn7 é selecionado para integração. Regiões de homologia a montante (attTn7 up) (iniciadores MCM78 e MCM79) e a jusante (attTn7 down) (iniciadores MCM88 e MCM89) são amplificadas por PCR a partir de células MG1655. Uma reação de 50 uL com 1uL de iniciadores a 10uM, 3uL de ddH2O, 45uL de Platinum PCR Supermix High Fidelity da Invitrogen e uma colônia raspada de MG1655 é desnaturada por 2:00 a 94°C, submetida a 25 ciclos (2:00 a 94°C, 0:30 a 50 °C e 1:00 a 68°C), extensão por 7:00 a 72°C e resfriada a 4°C. Este DNA resultante é clonado em pCR2.1 (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante, resultando nos plasmídeos MCM278 (attTn7 up) e MCM252 (attTn7 down). O fragmento de 832bp digerido com *Apa*I-*Pvu*I purificado em gel a partir de MCM252 é clonado no plasmídeo pR6K digerido com *Apa*I-*Pvu*I e purificado em gel, criando o plasmídeo MCM276. O fragmento de 825bp digerido com *Pst*I-*Not*I e purificado em gel a partir de MCM278 é clonado em MCM276 digerido com *Pst*I-*Not*I e purificado em gel, criando o plasmídeo MCM281.

ii) Clonagem da via inferior e promotor

Os genes MVK-PMK-MVD-IDI são amplificados a partir de pTrcKKDyIkIS com os iniciadores MCM104 e MCM105 usando o sistema de PCR Expand Long PCR da Roche de acordo com as instruções do fabricante.Este produto é digerido com *Not*I e *Apa*I e clonado em MCM281, que tinha

sido digerido com *Not*I e *Apa*I e purificado em gel. Os iniciadores MCM120 e MCM127 são usados para amplificar o cassete CMR a partir do DNA molde FRT-gb2-Cm-FRT da GeneBridges usando Pfu Ultra II da Stratagene.Um programa de PCR com desnaturação a 95°C por 4:00, 5 ciclos de 95°C por 0:20, 55°C por 0:20, 72°C por 2:00, 25 ciclos de 95°C por 0:20, 58°C por 0:20, 72°C por 2:00, 72°C por 10:00, e em seguida o resfriamento a 4°C é usado com quatro reações de PCR de 50uL contendo 1uL de molde a ~10ng/uL, 1uL de cada iniciador, 1,25 uL de dNTPs 10mM, 5uL de tampão 10x, 1uL de enzima e 39,75uL de ddH20. Reações são combinadas, purificadas em uma coluna de purificação de PCR da Qiagen e usadas na eletroporação de células Pir1 lavadas em água contendo o plasmídeo MCM296. A eletroporação é efetuada em cuvetas de 2mM a 2,5V e 200 ohms. As reações de eletroporação são recuperadas em LB por 3h a 30°C. O transformante MCM330 é selecionado em LA com CMP5, Kan50 (figuras 107 e 108A-108C).

iii) Integração em cromossoma de *E. coli*

O DNA de minipreparação (kit Qiaquick Spin) de MCM330 é digerido com *Sna*BI e usado na eletroporação de BL21(DE3) (Novagen) ou MG1655 contendo o plasmídeo pRedET Carb da GeneBridges. Células são cultivadas a 30°C até ~OD1, em seguida induzidas com 0,4% de L-arabinose a 37°C por 1,5 horas. Essas células são lavadas três vezes em ddH2O a 4°C antes da eletroporação com 2uL de DNA. Integrações são selecionadas em L ágar contendo cloranfenicol (5 ug/mL) e subsequentemente foi confirmado que elas não cresciam em L ágar + canamicina (50 ug/mL). A integração de MCM331 em BL21 e a integração de MCM333 em MG1655 são congeladas.

iv) Construção de pET24D-Kudzu que codifica a isopreno sintase de kudzu

O gene da isopreno sintase de kudzu é subclonado no vetor pET24d (Novagen) a partir do vetor pCR2.1 (Invitrogen). Em particular, o gene da isopreno sintase de kudzu é amplificado a partir do DNA molde p-TrcKudzu usando os iniciadores MCM50 5'-GATCATGCAT TCGCCCTTAG GAGGTAAAAA AACATGTGTG CGACCTCTTC TCAATTTACT (SEQ ID Nº:

99) e MCM53 5'-CGGTCGACGG ATCCCTGCAG TTAGACATAC ATCAGCTG (SEQ ID Nº: 100). Reações de PCR são executadas usando Taq DNA Polimerase (Invitrogen) e o produto de PCR resultante é clonado no vetor de clonagem pCR2.1-TOPO TA (Invitrogen) e transformado em células quimicamente competentes de *E. coli* Top10 (Invitrogen). Transformantes são plaqueados em L ágar contendo carbenicilina (50 µg/mL) e incubados durante a noite a 37°C. Culturas de 5 mL de caldo Luria contendo carbenicilina a 50 µg/ml são inoculadas com um só transformante e cultivadas durante a noite a 37°C. Cinco colônias são triadas pelo inserto correto por sequenciamento de DNA plasmidial isolado de 1 mL de cultura líquida (Caldo Luria) e purificado usando o kit de minipreparação QIAprep Spin (Qiagen). O plasmídeo resultante, designado MCM93, contém a sequência codificante de isopreno sintase de kudzu em um arcabouço de pCR2.1.

A sequência codificante de kudzu é removida por digestão de endonuclease de restrição com *Pci*I e *Bam*H1 (Roche) e purificada em gel usando o kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen). O DNA do vetor pET24d é digerido com *Nco*I e *Bam*HI (Roche), tratado com fosfatase alcalina de camarão (Roche) e purificado usando o kit QIAprep Spin Mini-prep (Qiagen). O fragmento de isopreno sintase de kudzu é ligado ao pET24d *Nco*I/*Bam*H1 digerido usando o kit Rapid DNA Ligation (Roche) em uma proporção de 5:1 de fragmento para vetor em um volume total de 20 µL. Uma parte de uma mistura de ligação (5 µL) é transformada em células quimicamente competentes de *E. coli* Top 10 e plaqueada em L ágar contendo canamicina (50 µg/mL). O transformante correto é confirmado por sequenciamento e transformado em células BL21(λDE3)pLysS quimicamente competentes (Novagen). Uma única colônia é selecionada após o crescimento durante a noite a 37°C em L ágar contendo canamicina (50 µg/mL). Um mapa do plasmídeo resultante designado como pET24D-Kudzu é mostrado na figura 109. A sequência de pET24D-Kudzu (SEQ ID Nº: 101) é mostrada nas figuras 110A e 110B. A atividade de isopreno sintase é confirmada usando um ensaio *headspace*.

v) Cepas de produção

As cepas MCM331 e MCM333 foram cotransformadas com os plasmídeos pCLPtrcupperpathway e pTrcKudzu ou pETKudzu, resultando nas cepas mostradas na Tabela 10.

Tabela 10. Cepas de Produção

Origem	Inferior Integrada	Plasmídeo de MVA Superior	Plasmídeo de isopreno sintase	Cepa de Produção
BL21(DE3)	MCM331	pCLPtrcUpper Pathway	pTrcKudzu	MCM343
BL21(DE3)	MCM331	pCLPtrcUpper Pathway	pET24D-Kudzu	MCM335
MG1655	MCM333	pCLPtrcUpper Pathway	pTrcKudzu	MCM345

vi) Fermentação de isopreno em *E. coli* expressando genes da via do mevalonato e cultivada em cultura de batelada alimentada na escala de 15 L.

Receita do meio (por litro de meio de fermentação):

O meio é gerado usando os seguintes componentes por litro de meio de fermentação: 7,5g de K_2HPO_4, 2g de $MgSO_4 * 7H_2O$, 2g de ácido cítrico mono-hidratado, 0,3g de citrato de amônio férrico, 0,5g de extrato de levedura e 1 mL de solução de metal traço modificada 1000X. Todos os componentes são adicionados e dissolvidos em diH_2O. Esta solução é autoclavada. O pH é ajustado para 7,0 com hidróxido de amônio (30%) e q.s. até o volume. Dez gramas de glicose, 0,1g de tiamina * HCl e antibióticos são adicionados após a esterilização e ajuste de pH.

Solução de Metal Traço Modificada 1000X:

A solução de metal traço modificada 1000X é gerada usando os seguintes componentes: 40 g de ácido cítrico * H_2O, 30 g de $MnSO_4 * H_2O$, 10 g de NaCl, 1 g de $FeSO_4 * 7H_2O$, 1 g de $CoCl_2 * 6H_2O$, 1 g de $ZnSO_4 * 7H_2O$, 100 mg de $CuSO_4 * 5H_2O$, 100 mg de H_3BO_3, 100 mg de $NaMoO_4 * 2H_2O$. Os componentes são dissolvidos um por vez em Di H_2O, pH a 3,0 com HCl/NaOH, em seguida q.s. até o volume esterilizado por filtração em filtro de 0,22 mícrons.

A fermentação foi realizada em um biorreator de 15 L com células de *E. coli* BL21(DE3) contendo a via inferior do MVA integrada gi1.2 descrita acima e os plasmídeos pCL PtrcUpperMVA e pTrcKudzu. Este experimento é realizado para monitorar a formação de glicose na temperatura de 30°C e pH 7,0 de fermentação desejados. Um inóculo de cepa de *E. coli* tirado de um recipiente congelado é estriado em uma placa de LB ágar (com antibióticos) e incubado a 37°C. Uma única colônia é inoculada em meio de triptona-extrato de levedura. Após o inóculo ser cultivado até a OD de 1,0, medida a 550 nm, 500 mL são usados para inocular um biorreator de 15 L contendo um volume de trabalho inicial de 5 L.

A glicose é adicionada em taxa exponencial até que as células atinjam a fase estacionária. Após este momento, a alimentação de glicose é diminuída para atender demandas metabólicas. A quantidade total de glicose distribuída ao biorreator durante a fermentação de 57 horas é de 3,9 kg. A indução é feita pela adição de IPTG. A concentração de IPTG é levada a 100 uM quando a taxa de evolução de dióxido de carbono atinge100 mmol/L/h. O perfil da OD_{550} no biorreator ao longo do tempo é apresentado na figura 111A. O nível de isopreno no gás de escape do biorreator é determinado conforme aqui descrito. O título de isopreno aumenta ao longo da fermentação até um valor final de 1,6 g/L (figura 111B). A produtividade específica de isopreno ao longo da fermentação é apresentada na figura 111C e picos em 1,2 mg/OD/h. A quantidade total de isopreno produzida durante a fermentação de 57 horas é de 16,2 g. O rendimento molar do carbono utilizado que entra na produção de isopreno durante a fermentação é de 0,9%. O rendimento em porcentagem de peso de isopreno a partir da glicose é de 0,4%.

XIV. Produção de isopreno em *E. coli* BL21 contendo a isopreno sintase de kudzu usando glicerol como fonte de carbono

Uma fermentação na escala de 15 L de *E. coli* expressando isopreno sintase de kudzu é usada para produzir isopreno em células alimentadas com glicerol em cultura de batelada alimentada. Este experimento demonstra que células em cultivo na presença de glicerol (sem glicose) resultam na produção de 2,2 g/L de isopreno.

Receita do meio (por litro de meio de fermentação): O meio é gerado usando os seguintes componentes por litro de meio de fermentação: 7,5g de K_2HPO_4, 2g de $MgSO_4 * 7H_2O$, 2g de ácido cítrico mono-hidratado, 0,3g de citrato de amônio férrico e 1 mL de solução de metal traço modificada 1000X. Todos os componentes são adicionados e dissolvidos em diH_2O. Esta solução é autoclavada. O pH é ajustado para 7,0 com hidróxido de amônio (30%) e q.s. até o volume. Glicerol, 5,1 g, 0,1g de tiamina * HCl e antibióticos são adicionados após a esterilização e ajuste de pH.

Solução de Metal Traço Modificada 1000X: O meio é gerado usando os seguintes componentes por litro de meio de fermentação: 40 g de ácido cítrico * H_2O, 30 g de $MnSO_4 * H_2O$, 10 g de NaCl, 1 g de $FeSO_4 * 7H_2O$, 1 g de $CoCl_2 * 6H_2O$, 1 g de $ZnSO_4 * 7H_2O$, 100 mg de $CuSO_4 * 5H_2O$, 100 mg de H_3BO_3, 100 mg de $NaMoO_4 * 2H_2O$. Os componentes são dissolvidos um por vez em diH_2O, pH a 3,0 com HCl/NaOH, em seguida q.s. até o volume esterilizado por filtração em filtro de 0,22 mícrons.

A fermentação é realizada em um biorreator de 15 L com células de *E. coli* BL21(DE3) contendo o plasmídeo pTrcKudzu. Este experimento é realizado para monitorar a formação de isopreno a partir de glicerol na temperatura de 35°C e pH 7,0 de fermentação desejados. Um inóculo de cepa de *E. coli* tirado de um recipiente congelado é estriado em uma placa de LA ágar (com antibióticos) e incubado a 37°C. Uma única colônia é inoculada em meio de peptona de soja-extrato de levedura-glicose e cultivada a 35°C. Após o inóculo ser cultivado até a OD de 1,0, medida a 550 nm, 600 mL são usados para inocular um biorreator de 7,5 L.

O glicerol é adicionado em taxa exponencial até que as células atinjam uma densidade ótica a 550 nm (OD_{550}) de 153.A quantidade total de glicerol distribuído ao biorreator durante a fermentação de 36 horas é de 1,7 kg. Fora a glicose no inóculo, nenhuma glicose é adicionada ao biorreator. A indução é feita pela adição de IPTG. A concentração de IPTG é levada a 20 uM quando a OD_{550} atinge um valor de 50. O perfil da OD_{550} no biorreator ao longo do tempo é apresentado na figura 57. O nível de isopreno no gás de escape do biorreator é determinado conforme aqui descrito. O título de iso-

preno aumenta ao longo da fermentação até um valor final de 2,2 g/L (figura 58). A quantidade total de isopreno produzida durante a fermentação de 54 horas é de 20,9 g e a evolução da produção ao longo do tempo é apresentada na figura 59.

XV. Fermentação de isopreno em *E. coli* expressando genes da via do mevalonato e cultivada em cultura de batelada alimentada na escala de 15 L usando açúcar invertido como fonte de carbono

Uma fermentação na escala de 15 L de *E. coli* expressando polipeptídeos da via do mevalonato e isopreno sintase de kudzu é usada para produzir isopreno em células alimentadas com açúcar invertido em cultura de batelada alimentada. Este experimento demonstra que células em cultivo na presença de açúcar invertido resultam na produção de 2,4 g/L de isopreno.

Receita do meio (por litro de meio de fermentação):

O meio é gerado usando os seguintes componentes por litro de meio de fermentação: 7,5g de K_2HPO_4, 2g de $MgSO_4 * 7H_2O$, 2g de ácido cítrico mono-hidratado, 0,3g de citrato de amônio férrico, 0,5g de extrato de levedura e 1 mL de solução de metal traço modificada 1000X. Todos os componentes são adicionados e dissolvidos em diH_2O. Esta solução é autoclavada. O pH é ajustado para 7,0 com hidróxido de amônio (30%) e q.s. até o volume. Dez gramas de açúcar invertido, 0,1g de tiamina * HCl e antibióticos são adicionados após a esterilização e ajuste de pH.

Solução de Metal Traço Modificada 1000X:

A solução de metal traço modificada 1000X é gerada usando os seguintes componentes: 40 g de ácido cítrico * H_2O, 30 g de $MnSO_4 * H_2O$, 10 g de NaCl, 1 g de $FeSO_4 * 7H_2O$, 1 g de $CoCl_2 * 6H_2O$, 1 g de $ZnSO_4 * 7H_2O$, 100 mg de $CuSO_4 * 5H_2O$, 100 mg de H_3BO_3, 100 mg de $NaMoO_4 * 2H_2O$. Os componentes são dissolvidos um por vez em Di H_2O, pH a 3,0 com HCl/NaOH, em seguida q.s. até o volume esterilizado por filtração em filtro de 0,22 mícrons.

A fermentação é realizada em um biorreator de 15 L com células de *E. coli* BL21(DE3) contendo os plasmídeos pCL PtrcUpperMVA e pTrc KKDyIkIS. Este experimento é realizado para monitorar a formação de iso-

preno a partir de açúcar invertido na temperatura de 30°C e pH 7,0 de fermentação desejados. Um inóculo de cepa de *E. coli* tirado de um recipiente congelado é estriado em uma placa de LB ágar (com antibióticos) e incubado a 37°C. Uma única colônia é inoculada em meio de triptona-extrato de levedura. Após o inóculo ser cultivado até a OD de 1,0, medida a 550 nm, 500 mL são usados para inocular um biorreator de 15 L contendo um volume de trabalho inicial de 5 L.

O açúcar invertido é adicionado em taxa exponencial até que as células atinjam a fase estacionária. Após este momento, a alimentação de açúcar invertido é diminuída para atender demandas metabólicas. A quantidade total de açúcar invertido distribuída ao biorreator durante a fermentação de 44 horas é de 2,4 kg. A indução é feita pela adição de IPTG. A concentração de IPTG é levada a 25 uM quando a densidade ótica a 550 nm (OD_{550}) atinge um valor de 9. A concentração de IPTG é elevada a 50 uM quando a OD_{550} atinge 200. O perfil da OD_{550} no biorreator ao longo do tempo é apresentado na figura 96. O nível de isopreno no gás de escape do biorreator é determinado conforme aqui descrito. O título de isopreno aumenta ao longo da fermentação até um valor final de 2,4 g/L (figura 97). A quantidade total de isopreno produzida durante a fermentação de 44 horas é de 18,4 g e a evolução da produção ao longo do tempo é apresentada na figura 98. O rendimento molar do carbono utilizado que entra na produção de isopreno durante a fermentação é de 1,7%. O rendimento em porcentagem de peso de isopreno a partir da glicose é de 0,8%.

Exemplo 9: Construção da via superior e inferior do MVA para integração em *Bacillus subtilis*

I. Construção da via Superior do MVA em *Bacillus subtilis*

A via superior de *Enterococcus faecalis* é integrada em *B. subtilis* sob o controle do promotor *aprE*. A via superior consiste em dois genes; *mvaE*, que codifica AACT e HMGR, e *mvaS*, que codifica HMGS. Os dois genes são fusionados a um códon de parada no meio deles, um sítio RBS na frente de *mvaS* e estão sob o controle do promotor *aprE*. Um terminador está situado após o gene *mvaE*. O marcador de resistência a cloranfenicol é

clonado após o gene *mvaE* e a construção é integrada no locus *aprE* por dupla permutação usando regiões flanqueadoras homólogas.

Quatro fragmentos de DNA são amplificados por PCR tal que eles contenham protusões que permitirão que eles sejam fusionados por uma reação de PCR. Amplificações por PCR são executadas usando Herculase polimerase de acordo com as instruções do fabricante.

1. PaprE

CF 07-134 (+) Início de promotor *aprE* PstI

5'- GACATCTGCAGCTCCATTTTCTTCTGC (SEQ ID Nº: 82)

CF 07-94 (-) Fusiona PaprE a *mvaE*

5'- CAATAATAACTACTGTTTTCACTCTTTACCCTCTCCTTTTAA (SEQ ID Nº: 83)

Molde: DNA cromossômico de *Bacillus subtilis*

2. *mvaE*

CF 07-93 (+) fusiona *mvaE* ao promotor *aprE* (códon de início GTG)

5'- TTAAAAGGAGAGGGTAAAGAGTGAAAACAGTAGTTATTATTG (SEQ ID Nº: 84)

CF 07-62 (-) Fusiona *mvaE* a *mvaS* com RBS no meio

5'- TTTATCAATCCCAATTGTCATGTTTTTTTACCTCCTTTATTGTTTTCTTAAATC (SEQ ID Nº: 35)

Molde: DNA cromossômico de *Enterococcus faecalis* (da ATCC)

3. *mvaS*

CF 07-61 (+) Fusiona *mvaE* a *mvaS* com RBS no meio

5'- GATTTAAGAAAACAATAAAGGAGGTAAAAAAACATGACA-ATT GGGATTGATAAA (SEQ ID Nº: 36)

CF 07-124 (-) Fusiona o final do *mvaS* ao terminador

5'- CGGGGCCAAGGCCGGTTTTTTTTAGTTTCGATAAGAAC-GAA CGGT (SEQ ID Nº: 85)

Molde: DNA cromossômico de *Enterococcus faecalis*

4. Terminador de serina protease alcalina de *B. amyliquefaciens*

CF 07-123 (+) Fusiona o final do mvaS ao terminador

5'- ACCGTTCGTTCTTATCGAAACTAAAAAAAACCGGCCTTGG CCCCG (SEQ ID Nº: 86)

CF 07-46 (-) Final do terminador de *B. amyliquefaciens* BamHI

5'- GACATGACGGATCCGATTACGAATGCCGTCTC (SEQ ID Nº: 63)

Molde: DNA cromossômico de *Bacillus amyliquefaciens*

Reações de Fusão por PCR

5. Fusionar *mvaE* a *mvaS*

CF 07-93 (+) fusiona *mvaE* ao promotor *aprE* (códon de início GTG)

5'- TTAAAAGGAGAGGGTAAAGAGTGAAAACAGTAGTTATTA TTG (SEQ ID Nº: 84)

CF 07-124 (-) Fusiona o final do *mvaS* ao terminador

5'- CGGGGCCAAGGCCGGTTTTTTTTAGTTTCGATAAGAACGAACGGT (SEQ ID Nº: 85)

Molde: #2 e 3 acima

6. Fusionar *mvaE-mvaS* ao promotor *aprE*

CF 07-134 (+) Início do promotor *aprE* PstI

5'- GACATCTGCAGCTCCATTTTCTTCTGC (SEQ ID Nº: 82)

CF 07-124 (-) Fusiona o final do *mvaS* ao terminador

5'- CGGGGCCAAGGCCGGTTTTTTTTAGTTTCGATAAGAACGAACGGT (SEQ ID Nº: 85)

Molde #1 e #4 acima

7. Fusiona PaprE-*mvaE-mvaS* ao terminador

CF 07-134 (+) Início de *aprE* promotor PstI

5'- GACATCTGCAGCTCCATTTTCTTCTGC (SEQ ID Nº: 82)

CF 07-46 (-) Final do terminador de *B. amyliquefaciens* BamHI

5'- GACATGACGGATCCGATTACGAATGCCGTCTC (SEQ ID Nº: 63)

Molde: #4 e #6

O produto é digerido com endonucleases de restrição *PstI*/*Bam*HI e ligado a pJM102 (Perego, M. 1993. Integrational vetors for genetic manipulation in *Bacillus subtilis*, p. 615–624. In A. L. Sonenshein, J. A. Hoch, e R. Losick (ed.), *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria: biochemistry, physiology, and molecular genetics. American Society for Microbiology, Washington, DC) que é digerido com *PstI*/*Bam*HI. A ligação é transformada em células quimicamente competentes de *E.coli* TOP 10 e transformantes são selecionados em LA contendo carbenicilina (50 µg/mL). O plasmídeo correto é identificado por sequenciamento e é designado pJMUpperpathway2 (figuras 50 e 51). O DNA plasmidial purificado é transformado em *Bacillus subtilis aprEnprE* Pxyl-*comK* e transformantes são selecionados em L ágar contendo cloranfenicol (5 µg/mL). Uma colônia correta é selecionada e é plaqueada sequencialmente em L ágar contendo cloranfenicol a 10, 15 e 25 µg/mL para amplificar o número de cópias do cassete contendo a via superior.

A cepa resultante é testada pela produção de ácido mevalônico pelo crescimento em LB contendo 1% de glicose e 1%. Culturas são analisadas por GC para a produção de ácido mevalônico. Esta cepa é usada subsequentemente como um hospedeiro para a integração da via inferior do mevalonato.

Os seguintes iniciadores são usados para sequenciar as várias construções acima.

Iniciadores de sequenciamento:

CF 07-134 (+) Início de promotor *aprE* PstI

5'-GACATCTGCAGCTCCATTTTCTTCTGC (SEQ ID Nº: 82)

CF 07-58 (+) Início de gene *mvaE*

5'-ATGAAAACAGTAGTTATTATTGATGC (SEQ ID Nº: 38)

CF 07-59 (-) Final do gene *mvaE*

5'-ATGTTATTGTTTTCTTAAATCATTTAAAATAGC (SEQ ID Nº: 39)

CF 07-82 (+) Início de gene *mvaS*

5'-ATGACAATTGGGATTGATAAAATTAG (SEQ ID Nº: 40)

CF 07-83 (-) Final do gene *mvaS*

5'-TTAGTTTCGATAAGAACGAACGGT (SEQ ID Nº: 41)

CF 07-86 (+) Sequência em *mvaE*

5'-GAAATAGCCCCATTAGAAGTATC (SEQ ID Nº: 42)

CF 07-87 (+) Sequência em *mvaE*

5'-TTGCCAATCATATGATTGAAAATC (SEQ ID Nº: 43)

CF 07-88 (+) Sequência em *mvaE*

5'-GCTATGCTTCATTAGATCCTTATCG (SEQ ID Nº: 44)

CF 07-89 (+) Sequência *mvaS*

5'-GAAACCTACATCCAATCTTTTGCCC (SEQ ID Nº: 45)

Transformantes são selecionados em LA contendo cloranfenicol em uma concentração de 5 µg/mL. Confirmou-se que uma colônia tinha a integração correta por sequenciamento e esta é plaqueada em LA contendo concentrações crescentes de cloranfenicol no decorrer de sete dias, até um nível final de 25 µg/mL. Isto resulta na amplificação do cassete contendo os genes de interesse. A cepa resultante é designada CF 455: pJMupperpathway#1 X *Bacillus subtilis aprEnprE* Pxyl *comK* (amplificada para crescer em LA contendo cloranfenicol a 25 µg/mL).

II. Construção de uma via inferior do MVA em *Bacillus subtilis*

A via inferior do MVA, consistindo nos genes *mvk1, pmk, mpd* e *idi* combinados em um cassete consistindo em regiões de DNA flanqueadoras da região nprE do cromossoma de *B. subtilis* (sítio de integração), no promotor *aprE*, e no marcador de resistência à espectinomicina (veja as figuras 28 e 29). Este cassete é sintetizado por DNA2.0 e é integrado ao cromossoma de *B. subtilis* contendo a via superior do MVA integrada no locus aprE. O gene da isopreno sintase de kudzu é expresso a partir do plasmídeo que se replica descrito no Exemplo 4 e é transformado na cepa tanto com a via superior como a inferior integradas.

Exemplo 10: Composições exemplares de isopreno e métodos para fazê-las

I. Análise Composicional de gás de escape da fermentação contendo isopreno

Uma fermentação na escala de 14 L é realizada com uma cepa

de *E. coli* BL21(DE3) recombinante contendo dois plasmídeos (pCL upper-Mev; pTrcKKDyIkIS que codifica a via completa do mevalonato para a biossíntese de precursor isoprenoide, uma isoprenil pirofosfato isomerase de levedura e uma isopreno sintase de kudzu. O gás de escape da fermentação do tanque de 14 L é coletado em recipientes de *headspace* de 20 mL aproximadamente no momento do pico de produtividade de isopreno (27,9 horas transcorridas do tempo de fermentação, "EFT") e analisado por *headspace* GC/MS pelos componentes voláteis.

A análise *headspace* é realizada com um sistema Agilent 6890 GC/MS equipado com uma coluna Agilent HP-5MS GC/MS (30 m x 250 µm; 0.25 µm de espessura de filme). Um injetor automático combiPAL é usado para amostragem de alíquotas de 500 uL a partir de recipientes *headspace* de 20 mL. O método de GC/MS utiliza hélio como o gás de arraste em um fluxo de 1 mL/min. A porta de injeção é mantida a 250°C com uma relação de divisão de 50:1. A temperatura do forno é mantida a 37°C para um período de 2 minutos iniciais, seguido por um aumento até 237°C em uma velocidade de 25°C/min para um tempo de método total de 10 minutos. O detector seletivo de massas Agilent 5793N faz varreduras de m/z 29 a m/z 300. O limite de detecção deste sistema é de aproximadamente 0,1 ug/L_{gas} ou aproximadamente 0,1 ppm. Se desejado, pode ser utilizado equipamento mais sensível com um limite de detecção menor.

O gás de escape consiste em 99,925 % (v/v) de gases permanentes (N_2, CO_2 e O_2), aproximadamente 0,075% de (2-metil-1,3-butadieno) isopreno (~750 ppmv, 2100 µg/L) e quantidades menores (<50 ppmv) de etanol, acetona, e dois alcoóis C5 prenílicos. A quantidade de vapor de água não é determinada, mas é estimada como sendo igual à pressão de vapor em equilíbrio a 0°C. A composição da fração orgânica volátil é determinada por integração da área sob os picos no cromatograma de GC/MS (figuras 86A e 86B) e é listada na Tabela 6. As curvas de calibração para padrões de etanol e acetona permitiram a conversão de área GC área em concentração de fase gasosa em unidade de ug/L usando métodos padrão.

Tabela 6. Composição de componentes orgânicos voláteis no gás de escape de fermentação.

O gás de escape é analisado no tempo de 27,9 horas de uma fermentação usando uma cepa *E. coli* BL21(DE3) expressando uma via do mevalonato heteróloga, uma isoprenil pirofosfato isomerase de levedura e uma isopreno sintase de kudzu.

Composto	*RT (min)*	*GC área*	*Área %*	*Conc. (ug/L)*
Etanol	1,669	239005	0,84	62 +/- 6
Acetona	1,703	288352	1,02	42 +/- 4
(2-metil-1,3-butadieno) Isopreno	1,829	27764544	97,81	2000 +/- 200
3-metil-3-buten-1-ol	3,493	35060	0,12	<10
3-metil-2-buten-1-ol	4,116	58153	0,20	<10

II. Medição de traços de compostos orgânicos voláteis (VOCs) coproduzidos com isopreno durante a fermentação de uma cepa de *E. coli* recombinante

Uma fermentação na escala de 14 L é realizada com uma cepa de *E. coli* BL21(DE3) recombinante contendo dois plasmídeos (pCL upper-Mev; pTrcKKDyIkIS) que codifica a via completa do mevalonato para a biossíntese de precursor isoprenoide, uma isoprenil pirofosfato isomerase de levedura e uma isopreno sintase de kudzu.

O gás de escape da fermentação é passado por recipientes *headspace* resfriados a fim de concentrar e identificar traços de componentes orgânicos voláteis. O gás de escape desta fermentação é amostrado em uma taxa de 1 L/min por 10 minutos através de um recipiente *headspace* de 20 mL empacotado com lã de quartzo (2g) e resfriado a –78°C com gelo seco. O recipiente é tampado novamente com uma tampa de recipiente nova e analisado por *headspace* GC/MS para VOCs capturados usando as condições descritas no Exemplo 10, parte I. As proporções de compostos observadas nas figuras 87A-87D são uma combinação de nível global no gás de escape de fermentação, a pressão de vapor relativa a -78°C, e a resposta do detector do espectrômetro de massas. Por exemplo, o nível baixo de isopreno em relação aos volá-

teis oxigenados (por exemplo, acetona e etanol) é uma função da alta volatilidade deste material tal que ele não se acumula no recipiente *headspace* a -78°C.

A presença de muitos desses compostos é única para composições de isopreno derivadas de fontes biológicas. Os resultados são representados nas figuras 87A-87D e resumidos nas Tabelas 7A e 7B.

Tabela 7A: Voláteis traços presentes em gás de escape produzido por *E. coli* BL21(DE3) (pCL upperMev; pTrcKKDyIkIS) após criocaptura a -78°C.

Composto	*RT (min)*	*Área GC*[1]	*% de área*[2]	*Proporção em %*[3]
Acetaldeído	1,542	4019861	4,841	40,14
Etanol	1,634	10553620	12,708	105,39
Acetona	1,727	7236323	8,714	72,26
2-metil-1,3-butadieno	1,777	10013714	12,058	100,00
1-propanol	1,987	163574	0,197	1,63
Diacetila	2,156	221078	0,266	2,21
2-metil-3-buten-2-ol	2,316	902735	1,087	9,01
2-metil-1-propanol	2,451	446387	0,538	4,46
3-metil-1-butanal	2,7	165162	0,199	1,65
1-butanol	2,791	231738	0,279	2,31
3-metil-3-buten-1-ol	3,514	14851860	17,884	148,32
3-metil-1-butanol	3,557	8458483	10,185	84,47
3-metil-2-buten-1-ol	4,042	18201341	21,917	181,76
3-metil-2-butenal	4,153	1837273	2,212	18,35
Acetato de 3-metilbutila	5,197	196136	0,236	1,96
Acetato de 3-metil-3-buten-1-ila	5,284	652132	0,785	6,51
2-heptanona	5,348	67224	0,081	0,67
2,5-dimetilpirazina	5,591	58029	0,070	0,58
Acetato de 3-metil-2-buten-1-ila	5,676	1686507	2,031	16,84
6-metil-5-hepten-2-ona	6,307	101797	0,123	1,02
2,4,5-trimetilpiridina	6,39	68477	0,082	0,68

Composto	*RT (min)*	*Área GC*[1]	*% de área*[2]	*Proporção em %*[3]
2,3,5-trimetilpirazina	6,485	30420	0,037	0,30
(E)-3,7-dimetil-1,3,6-octatrieno	6,766	848928	1,022	8,48
(Z)-3,7-dimetil-1,3,6-octatrieno	6,864	448810	0,540	4,48
Butirato de 3-metil-2-buten-1-ila_	7,294	105356	0,127	1,05
Citronellal	7,756	208092	0,251	2,08
2,3-ciclo-heptenolpiridina	8,98	1119947	1,349	11,18

[1] Área GC é a área não corrigida sob o pico correspondente ao composto listado.

[2] % de área é a área do pico expressa como uma % relativa à área total do pico de todos os compostos.

[3] Proporção em % é a área do pico expressa como uma % relativa à área do pico de 2-metil-1,3-butadieno.

Tabela 7B. Voláteis traços presentes em gás de escape produzido por *E. coli* BL21(DE3) (pCL upperMev; pTrcKKDylkIS) após criocaptura a -196°C.

Composto	*RT (min)*	*Área GC*[1]	*% de área*[2]	*Proporção em %*[3]
Acetaldeído	1,54	1655710	0,276	0,33
Metanotiol	1,584	173620	0,029	0,03
Etanol	1,631	10259680	1,707	2,03
Acetona	1,722	73089100	12,164	14,43
2-metil-1,3-butadieno	1,771	506349429	84,269	100,00
acetato de metila	1,852	320112	0,053	0,06
1-propanol	1,983	156752	0,026	0,03
Diacetila	2,148	67635	0,011	0,01
2-butanona	2,216	254364	0,042	0,05
2-metil-3-buten-2-ol	2,312	684708	0,114	0,14
acetato de etila	2,345	2226391	0,371	0,44
2-metil-1-propanol	2,451	187719	0,031	0,04
3-metil-1-butanal	2,696	115723	0,019	0,02

Composto	*RT (min)*	*Área GC*[1]	*% de área*[2]	*Proporção em %*[3]
3-metil-2-butanona	2,751	116861	0,019	0,02
1-butanol	2,792	54555	0,009	0,01
2-pentanona	3,034	66520	0,011	0,01
3-metil-3-buten-1-ol	3,516	1123520	0,187	0,22
3-metil-1-butanol	3,561	572836	0,095	0,11
isobutirato de etila	3,861	142056	0,024	0,03
3-metil-2-buten-1-ol	4,048	302558	0,050	0,06
3-metil-2-butenal	4,152	585690	0,097	0,12
acetato de butila	4,502	29665	0,005	0,01
acetato de 3- metilbutila	5,194	271797	0,045	0,05
Acetato de 3-metil-3-buten-1-ila	5,281	705366	0,117	0,14
Acetato de 3-metil-2-buten-1-ila	5,675	815186	0,136	0,16
(E)-3,7-dimetil-1,3,6-octatrieno	6,766	207061	0,034	0,04
(Z)-3,7-dimetil-1,3,6-octatrieno	6,863	94294	0,016	0,02
2,3-ciclo-heptenolpiridina	8,983	135104	0,022	0,03

[1] Área GC é a área não corrigida sob o pico correspondente ao composto listado.

[2] % de área é a área do pico expressa como uma % relativa à área total do pico de todos os compostos.

[3] Proporção em % é a área do pico expressa como uma % relativa à área do pico de 2-metil-1,3-butadieno.

III. Ausência de isômeros de hidrocarbonetos C5 em isopreno derivado de fermentação.

A criocaptura do isopreno presente no gás de escape da fermentação é realizada usando um recipiente *headspace* de 2 mL resfriado em nitrogênio líquido. O gás de escape (1 L/min) é passado por um recipiente de 20 mL contendo pelotas de hidróxido de sódio a fim de minimizar o acúmulo de CO_2 sólido e em gelo no recipiente de 2 mL (-196°C). Aproximadamente 10L de gás de escape são passados pelo recipiente, após o que são aqueci-

dos até -78°C com ventilação, seguido pelo fechamento, de novo, com uma tampa de recipiente nova e análise por GC/MS.

A análise por GC/MS *headspace* é realizada com um sistema Agilent 6890 GC/MS usando uma seringa hermética a gás de100uL no modo *headspace*. Uma coluna Zebron ZB-624 GC/MS (30 m x 250 µm; espessura de filme de 1,40 µm) é usada para separação de analitos. O injetor automático GC é equipado com uma seringa hermética a gás de 100 uL e a altura da agulha é ajustada para permitir a injeção de uma amostra *headspace* de 50 uL de um recipiente GC de 2 mL. O método GC/MS utiliza hélio como o gás de arraste em um fluxo de 1 mL/min. A porta de injeção é mantida a 200°C com uma relação de divisão de 20:1. A temperatura do forno é mantida a 37°C para os 5 minutos de duração da análise. O detector seletivo de massas Agilent 5793N é executado no modo de monitoramento de íon único em m/z 55, 66, 67 e 70. Sob essas condições, observa-se que o isopreno é eluído em 2,966 minutos (figura 88B). Um padrão de isopreno derivado de petróleo (Sigma-Aldrich) também é analisado usando este método e descobriu-se que contém isômeros de hidrocarbonetos C5 adicionais, que são eluídos pouco antes ou depois do pico principal e são quantificados com base na área GC corrigida (figura 88A).

Tabela 8A: Análise GC/MS de isopreno derivado de petróleo

Composto	*RT (min)*	*Área GC*	*% de área de hidrocarbonetos C5 totais*
2-metil-1-buteno	2,689	$18,2 \times 10^3$	0,017%
(Z)-2-penteno	2,835	$10,6 \times 10^4$	0,101%
Isopreno	2,966	$10,4 \times 10^7$	99,869%
1,3-ciclopentadieno (CPD)	3,297	$12,8 \times 10^3$	0,012%

Tabela 8B: Análise GC/MS de isopreno derivado de fermentação (% de hidrocarbonetos C5 totais)

Composto	*RT (min)*	*Área GC corrigida*	*% de hidrocarbonetos C5 totais*
Isopreno	2,966	$8,1 \times 10^7$	100%

Em um experimento separado, uma mistura padrão de hidrocarbonetos C5 é analisada para determinar se a resposta do detector é a mesma para cada um dos compostos. Os compostos são 2-metil-1-buteno, 2-metil-1,3-butadieno, (E)-2-penteno, (Z)-2-penteno e (E)-1,3-pentadieno. Neste caso, a análise é realizada em uma coluna Agilent DB-Petro (100 m x 0,25 mm, 0,50 um espessura de filme) mantida a 50°C por 15 minutos. O método GC/MS utiliza hélio como o gás de arraste em um fluxo de 1 mL/min. A porta de injeção é mantida a 200°C com uma relação de divisão de 50:1. O detector seletivo de massas Agilent 5793N é executado no modo de varredura completa de m/z 19 a m/z 250. Sob essas condições, uma concentração de 100 ug/L de cada padrão produz a mesma resposta de detector dentro do erro experimental.

IV. Composições compreendendo isopreno adsorvido a uma fase sólida.

O isopreno produzido biologicamente é adsorvido ao carbono ativado resultando em uma fase sólida contendo 50 a 99,9% de carbono, 0,1% a 50% de isopreno, 0,01% a 5% de água, e quantidades menores (<0,1%) de outros componentes orgânicos voláteis.

O gás de escape de fermentação é lançado através de uma serpentina de condensação de cobre mantida a 0°C, seguido por um filtro de dessecação de sílica granulada a fim de remover vapor d'água. O gás de escape desumidificado é em seguida lançado através de filtros contendo carbono (Koby Jr, Koby Filters, MA) até o ponto em que o surgimento de isopreno foi detectado no filtro de escape por GC/MS. A quantidade de isopreno adsorvido ao cartucho pode ser determinada indiretamente pelo cálculo da concentração no gás de escape, a vazão geral e o surgimento porcentual no decorrer do período de coleta. Senão, o isopreno adsorvido pode ser recuperado a partir dos filtros por dessorção térmica, a vácuo ou mediada por solvente.

V. Coleta e análise de isopreno condensado.

O gás de escape de fermentação é desumidificado e o CO_2 removido por filtração através de um adsorvente adequado (por exemplo, ascarite). O fluxo de gás de escape resultante é em seguida lançado através

de um condensador resfriado por nitrogênio líquido a fim de condensar os VOCs no fluxo. A vasilha de coleta contém t-butil catecol para inibir o condensado de isopreno resultante. O condensado é analisado por GC/MS e RMN a fim de determinar a pureza usando métodos padrão, tal como aqueles aqui descritos.

VI. Produção de alcoóis prenílicos por fermentação

A análise de gás de escape de uma cepa de *E. coli* BL21(DE3) expressando uma isopreno sintase de kudzu revela a presença tanto de isopreno como de 3-metil-3-buten-1-ol (isoprenol). Os níveis dos dois compostos no gás de escape da fermentação no decorrer da fermentação são mostrados na figura 89 conforme determinado por *headspace* GC/MS. Os níveis de isoprenol (3-metil-3-buten-1-ol, 3-MBA) alcançados são quase 10 ug/$L_{gás\ de\ escape}$ neste experimento. Experimentos adicionais produzem níveis de aproximadamente 20 ug/$L_{gás\ de\ escape}$ no gás de escape de fermentação.

Exemplo 11: O desacoplamento entre crescimento e produção de isopreno em *E. coli* expressando genes da via do mevalonato e fermentada em uma cultura de batelada alimentada

Este Exemplo 11 ilustra o desacoplamento do crescimento celular a partir de ácido mevalônico e produção de isopreno.

I. Condições de Fermentação

Receita do meio (por litro de meio de fermentação):

O meio é gerado usando os seguintes componentes por litro de meio de fermentação: 7,5g de K_2HPO_4, 2g de $MgSO_4$ * $7H_2O$, 2g de ácido cítrico mono-hidratado, 0,3g de citrato de amônio férrico, 0,5g de extrato de levedura e 1 mL de solução de metal traço modificada 1000X. Todos os componentes são adicionados e dissolvidos em diH_2O. Esta solução é autoclavada. O pH é ajustado para 7,0 com hidróxido de amônio (30%) e q.s. até o volume. Dez gramas de glicose, 0,1g de tiamina * HCl e antibióticos são adicionados após a esterilização e ajuste de pH.

Solução de Metal Traço Modificada 1000X:

A solução de metal traço modificada 1000X é gerada usando os seguintes componentes: 40 g de ácido cítrico * H_2O, 30 g de $MnSO_4$ * H_2O,

10 g de NaCl, 1 g de $FeSO_4 * 7H_2O$, 1 g de $CoCl_2 * 6H_2O$, 1 g de $ZnSO_4 * 7H_2O$, 100 mg de $CuSO_4 * 5H_2O$, 100 mg de H_3BO_3, 100 mg de $NaMoO_4 * 2H_2O$. Os componentes são dissolvidos um por vez em Di H_2O, pH a 3,0 com HCl/NaOH, em seguida q.s. até o volume e esterilizados por filtração em filtro de 0,22 mícrons.

A fermentação é realizada com células de *E. coli* contendo os plasmídeos pTrcHis2AUpperPathway (também chamado pTrcUpperMVA, figuras 91 e 92A-92C) (carbenicilina a 50 µg/mL) ou o pCL PtrcUpperMVA (também chamado pCL PtrcUpperPathway (figura 26)) (espectinomicina a 50 µg/mL). Para experimentos em que isopreno é produzido, as células de *E. coli* também contêm o plasmídeo pTrc KKDyIkIS (canamicina a 50 µg/mL). Estes experimentos são realizados para monitorar a formação de ácido mevalônico ou isopreno a partir de glicose na temperatura de 30°C e pH 7,0 de fermentação desejados. Um inóculo de cepa de *E. coli* tirado de um recipiente congelado é estriado em uma placa de LA ágar (com antibióticos) e incubado a 37°C. Uma única colônia é inoculada em meio de triptona-extrato de levedura. Após o inóculo ser cultivado até a OD de 1,0, quando medida a 550 nm, ele é usado para inocular o biorreator.

A glicose é adicionada em taxa exponencial até que as células atinjam a fase estacionária. Após este momento, a alimentação de glicose é diminuída para atender demandas metabólicas. A indução é feita pela adição de IPTG. A concentração do ácido mevalônico no caldo de fermentação é determinada pela aplicação de amostras tratadas com ácido perclórico (Sigma-Aldrich # 244252) (incubadas com 0,3 M a 4°C por 5 minutos) em uma coluna de HPLC de ácidos orgânicos (BioRad # 125-0140). A concentração é determinada pela comparação do tamanho do pico do ácido mevalônico do caldo com uma curva de calibração gerada a partir de mevalonolacetona (Sigma-Aldrich # M4667) tratada com ácido perclórico para formar D,L-mevalonato. O nível de isopreno no gás de escape do biorreator é determinado conforme aqui descrito. O título de isopreno é definido como a quantidade de isopreno produzido por litro de caldo de fermentação.

II. Produção de ácido mevalônico em células de *E. coli* BL21(DE3) expressando o plasmídeo pTrcUpperMVA em uma escala de 150 L

Células BL21(DE3) que são cultivadas em uma placa como explicado acima no Exemplo 11, parte I são inoculadas em um frasco contendo 45 mL de meio triptona-extrato de levedura e incubadas a 30°C com agitação a 170 rpm por 5 horas. Esta solução é transferida para um biorreator de 5 L com meio triptona-extrato de levedura e as células são cultivadas a 30°C e 27,5 rpm até a cultura atingir uma OD_{550} de 1,0. Os 5 L de inóculo são semeados em um biorreator de 150 L contendo 45 kg de meio. A concentração de IPTG é levada a 1,1 mM quando a OD_{550} atinge um valor de 10. O perfil da OD_{550} no biorreator ao longo do tempo é apresentado na figura 60A. O nível de isopreno no gás de escape do biorreator é determinado conforme aqui descrito. O título de ácido mevalônico aumenta ao longo da fermentação até um valor final de 61,3 g/L (figura 60B). O perfil de produtividade específica ao longo da fermentação é apresentado na figura 60C e a comparação com a figura 60A ilustra o desacoplamento entre crescimento e produção de ácido mevalônico. A quantidade total de ácido mevalônico produzida durante a fermentação de 52,5 horas é de 4,0 kg para 14,1 kg de glicose utilizada. O rendimento molar do carbono utilizado que entra na produção de ácido mevalônico durante a fermentação é de 34,2%.

III. Produção de ácido mevalônico em células de *E. coli* BL21(DE3) expressando o plasmídeo pTrcUpperMVA em uma escala de15 L

Células BL21(DE3) que são cultivadas em uma placa como explicado acima no Exemplo 11, parte I são inoculadas em um frasco contendo 500 mL de meio triptona-extrato de levedura e cultivadas em 30°C a 160 rpm até a OD_{550} de 1,0. Este material é semeado em um biorreator de 15 L contendo 4,5 kg de meio. A concentração de IPTG é levada a 1,0 mM quando a OD_{550} atinge um valor de 10. O perfil da OD_{550} no biorreator ao longo do tempo é apresentado na figura 61A. O título de ácido mevalônico aumenta ao longo da fermentação até um valor final de 53,9 g/L (figura 61B). O perfil de produtividade específica ao longo da fermentação é apresentado na figura 61C e a comparação com a figura 61A ilustra o desacoplamento entre

crescimento e produção de ácido mevalônico. A quantidade total de ácido mevalônico produzida durante a fermentação de 46,6 horas é de 491 g para 2,1 kg de glicose utilizada. O rendimento molar do carbono utilizado que entra na produção de ácido mevalônico durante a fermentação é de 28,8%.

IV. Produção de ácido mevalônico em células de *E. coli* FM5 expressando o plasmídeo pTrcUpperMVA em uma escala de15 L

Células FM5 que são cultivadas em uma placa como explicado acima no Exemplo 11, parte I são inoculadas em um frasco contendo 500 mL de meio triptona-extrato de levedura e cultivadas em 30°C a 160 rpm até a OD_{550} de 1,0. Este material é semeado em um biorreator de 15 L contendo 4,5 kg de meio. A concentração de IPTG é levada a 1,0 mM quando a OD_{550} atinge um valor de 30. O perfil da OD_{550} no biorreator ao longo do tempo é apresentado na figura 62A. O título de ácido mevalônico aumenta ao longo da fermentação até um valor final de 23,7 g/L (figura 62B). O perfil de produtividade específica ao longo da fermentação é apresentado na figura 62C e a comparação com a figura 62A ilustra o desacoplamento entre crescimento e produção de ácido mevalônico. A quantidade total de ácido mevalônico produzida durante a fermentação de 51,2 horas é de 140 g para 1,1 kg de glicose utilizada. O rendimento molar do carbono utilizado que entra na produção de ácido mevalônico durante a fermentação é de 15,2%.

V. Produção de isopreno em células de *E. coli* BL21(DE3) expressando os plasmídeos pCL PtrcUpperMVA e pTrc KKDyIkIS em uma escala de15 L

Células BL21(DE3) expressando os plasmídeos pCL PtrcUpperMVA e pTrc KKDyIkIS que são cultivadas em uma placa como explicado acima no Exemplo 11, parte I são inoculadas em um frasco contendo 500 mL de meio triptona-extrato de levedura e cultivadas em 30°C a 160 rpm até a OD_{550} de 1,0. Este material é semeado em um biorreator de 15 L contendo 4,5 kg de meio. A concentração de IPTG é levada a 25 µM quando a OD_{550} atinge um valor de 10. A concentração de IPTG é elevada a 50 uM quando a OD_{550} atinge 190. A concentração de IPTG é elevada a 100 uM em 38 horas de fermentação. O perfil da OD_{550} no biorreator ao longo do tempo é apresentado na figura 63A. O título de isopreno aumenta ao longo da fermenta-

ção até um valor final de caldo de 2,2 g/L (figura 63B). O perfil de produtividade específica ao longo da fermentação é apresentado na figura 63C e a comparação com a figura 63A ilustra o desacoplamento entre crescimento e produção de isopreno. A quantidade total de isopreno produzido durante a fermentação de 54,4 horas é de 15,9 g para 2,3 kg de glicose utilizada. O rendimento molar do carbono utilizado que entra na produção de isopreno durante a fermentação é de 1,53%.

VI. Produção de isopreno em células de sintonização (*tuner*) de *E. coli* BL21(DE3) expressando os plasmídeos pCL PtrcUpperMVA e pTrc KKDyIkIS em uma escala de15 L

Células de sintonização BL21(DE3) expressando os plasmídeos pCL PtrcUpperMVA e pTrc KKDyIkIS que são cultivadas em uma placa como explicado acima no Exemplo 11, parte I são inoculadas em um frasco contendo 500 mL de meio triptona-extrato de levedura e cultivadas em 30°C a 160 rpm até a OD_{550} de 1,0. Este material é semeado em um biorreator de 15 L contendo 4,5 kg de meio. A concentração de IPTG é levada a 26 μM quando a OD_{550} atinge um valor de 10. A concentração de IPTG é elevada a 50 uM quando a OD_{550} atinge 175. O perfil da OD_{550} no biorreator ao longo do tempo é apresentado na figura 64A. O título de isopreno aumenta ao longo da fermentação até um valor final de caldo de 1,3 g/L (figura 64B). O perfil de produtividade específica ao longo da fermentação é apresentado na figura 64C e a comparação com a figura 64A ilustra o desacoplamento entre crescimento e produção de isopreno. A quantidade total de isopreno produzido durante a fermentação de 48,6 horas é de 9,9 g para 1,6 kg de glicose utilizada. O rendimento molar do carbono utilizado que entra na produção de isopreno durante a fermentação é de 1,34%.

VII. Produção de isopreno em células de *E. coli* MG1655 expressando os plasmídeos pCL PtrcUpperMVA e pTrc KKDyIkIS em uma escala de15 L

Células MG1655 expressando os plasmídeos pCL PtrcUpperMVA e pTrc KKDyIkIS que são cultivadas em uma placa como explicado acima no Exemplo 11, parte I são inoculadas em um frasco contendo 500 mL de meio triptona-extrato de levedura e cultivadas em 30°C a 160 rpm até a

OD_{550} de 1,0. Este material é semeado em um biorreator de 15 L contendo 4,5 kg de meio. A concentração de IPTG é levada a 24 μM quando a OD_{550} atinge um valor de 45. O perfil da OD_{550} no biorreator ao longo do tempo é apresentado na figura 65A. O título de isopreno aumenta ao longo da fermentação até um valor final de caldo de 393 mg/L (figura 65B). O perfil de produtividade específica ao longo da fermentação é apresentado na figura 65C e a comparação com a figura 65A ilustra o desacoplamento entre crescimento e produção de isopreno. A quantidade total de isopreno produzido durante a fermentação de 67,4 horas é de 2,2 g para 520 g de glicose utilizada. O rendimento molar do carbono utilizado que entra na produção de isopreno durante a fermentação é de 0,92%.

VIII. Produção de isopreno em células de *E. coli* MG1655ack-pta expressando os plasmídeos pCL PtrcUpperMVA e pTrc KKDyIkIS em uma escala de 15 L

Células MG1655ack-pta expressando os plasmídeos pCL PtrcUpperMVA e pTrc KKDyIkIS que são cultivadas em uma placa como explicado acima no Exemplo 11, I são inoculadas em um frasco contendo 500 mL de meio triptona-extrato de levedura e cultivadas em 30°C a 160 rpm até a OD_{550} de 1,0. Este material é semeado em um biorreator de 15 L contendo 4,5 kg de meio. A concentração de IPTG é levada a 30 μM quando a OD_{550} atinge um valor de 10. O perfil da OD_{550} no biorreator ao longo do tempo é apresentado na figura 66A. O título de isopreno aumenta ao longo da fermentação até um valor final de caldo de 368 mg/L (figura 66B). O perfil de produtividade específica ao longo da fermentação é apresentado na figura 66C e a comparação com a figura 66A ilustra o desacoplamento entre crescimento e produção de isopreno. A quantidade total de isopreno produzido durante a fermentação de 56,7 horas é de 1,8 g para 531 g de glicose utilizada. O rendimento molar do carbono utilizado que entra na produção de isopreno durante a fermentação é de 0,73%.

IX. Produção de isopreno em células de *E. coli* FM5 expressando os plasmídeos pCL PtrcUpperMVA e pTrc KKDyIkIS em uma escala de 15 L

Células FM5 expressando os plasmídeos pCL PtrcUpperMVA e

pTrc KKDylkIS que são cultivadas em uma placa como explicado acima no Exemplo 11, parte I são inoculadas em um frasco contendo 500 mL de meio triptona-extrato de levedura e cultivadas em 30°C a 160 rpm até a OD_{550} de 1,0. Este material é semeado em um biorreator de 15 L contendo 4,5 kg de meio. A concentração de IPTG é levada a 27 µM quando a OD_{550} atinge um valor de 15. O perfil da OD_{550} no biorreator ao longo do tempo é apresentado na figura 67A. O título de isopreno aumenta ao longo da fermentação até um valor final de caldo de 235 mg/L (figura 67B). O perfil de produtividade específica ao longo da fermentação é apresentado na figura 67C e a comparação com a figura 67A ilustra o desacoplamento entre crescimento e produção de isopreno. A quantidade total de isopreno produzido durante a fermentação de 52,3 horas é de 1,4 g para 948 g de glicose utilizada. O rendimento molar do carbono utilizado que entra na produção de isopreno durante a fermentação é de 0,32%.

Exemplo 12: Produção de isopreno durante a fase de crescimento exponencial de *E. coli* expressando genes da via do mevalonato e fermentada em uma cultura de batelada alimentada

O Exemplo 12 ilustra a produção de isopreno durante a fase de crescimento exponencial das células.

Receita do meio (por litro de meio de fermentação):

O meio é gerado usando os seguintes componentes por litro de meio de fermentação: 7,5g de K_2HPO_4, 2g de $MgSO_4 * 7H_2O$, 2g de ácido cítrico mono-hidratado, 0,3g de citrato de amônio férrico, 0,5g de extrato de levedura e 1 mL de solução de metal traço modificada 1000X. Todos os componentes são adicionados e dissolvidos em diH_2O. Esta solução é autoclavada. O pH é ajustado para 7,0 com hidróxido de amônio (30%) e q.s. até o volume. Dez gramas de glicose, 0,1g de tiamina * HCl e antibióticos são adicionados após a esterilização e ajuste de pH.

Solução de Metal Traço Modificada 1000X:

A solução de metal traço modificada 1000X é gerada usando os seguintes componentes: 40 g de ácido cítrico * H_2O, 30 g de $MnSO_4 * H_2O$, 10 g de NaCl, 1 g de $FeSO_4 * 7H_2O$, 1 g de $CoCl_2 * 6H_2O$, 1 g de $ZnSO_4$ *

$7H_2O$, 100 mg de $CuSO_4 * 5H_2O$, 100 mg de H_3BO_3, 100 mg de $NaMoO_4 * 2H_2O$. Os componentes são dissolvidos um por vez em Di H_2O, pH a 3,0 com HCl/NaOH, em seguida q.s. até o volume e esterilizados por filtração em filtro de 0,22 mícrons.

A fermentação é realizada em um biorreator de 15 L com células de *E. coli* ATCC11303 contendo os plasmídeos pCL PtrcUpperMVA e pTrc KKDyIkIS. Este experimento é realizado para monitorar a formação de isopreno a partir de glicose na temperatura de 30°C e pH 7,0 de fermentação desejados. Um inóculo de cepa de *E. coli* tirado de um recipiente congelado é estriado em uma placa de LB ágar (com antibióticos) e incubado a 37°C. Uma única colônia é inoculada em meio de triptona-extrato de levedura. Após o inóculo ser cultivado até a OD de 1,0, medida a 550 nm, 500 mL são usados para inocular um biorreator de 15 L contendo um volume de trabalho inicial de 5 L.

A glicose é adicionada em taxa exponencial até que as células atinjam a fase estacionária. Após este momento, a alimentação de glicose é diminuída para atender demandas metabólicas. A quantidade total de glicose distribuída ao biorreator durante a fermentação de 50 horas é de 2,0 kg. A indução é feita pela adição de IPTG. A concentração de IPTG é levada a 25 uM quando a densidade ótica a 550 nm (OD_{550}) atinge um valor de 10. A concentração de IPTG é elevada a 50 uM quando a OD_{550} atinge 190. O perfil da OD_{550} no biorreator ao longo do tempo é apresentado na figura 99. O nível de isopreno no gás de escape do biorreator é determinado conforme aqui descrito. O título de isopreno aumenta ao longo da fermentação até um valor final de 1,4 g/L (figura 100). A quantidade total de isopreno produzida durante a fermentação de 50 horas é de 10,0 g. O perfil de produtividade específica de isopreno ao longo do tempo no biorreator é apresentado na figura 101. O rendimento molar do carbono utilizado que contribui para a produção de isopreno durante a fermentação é de 1,1%. O rendimento em porcentagem de peso de isopreno a partir da glicose é de 0,5%.

Exemplo 13: Modelagem de inflamabilidade e testes de isopreno

I. Resumo de modelagem de inflamabilidade e testes de isopreno

Modelagem de inflamabilidade e experimentos são realizados para várias

misturas de hidrocarboneto/oxigênio/nitrogênio/água/dióxido de carbono. Esta modelagem e testes experimentais têm como objetivo definir as curvas de inflamabilidade de isopreno e oxigênio/nitrogênio sob concentrações de monóxido de carbono e vapor especificadas em uma pressão e temperatura fixas. Uma matriz das condições do modelo é apresentada na Tabela 4 e uma matriz dos experimentos realizados é apresentada na Tabela 5.

Tabela 4. Resumo da Inflamabilidade de Isopreno do Modelo

Séries	Temperatura (°C)	Pressão Kg/cm^2 (psig)	Concentração de Vapor (peso %)	Concentração de Dióxido de Carbono (peso %)	Concentração de Isopreno (vol. %)	Concentração de Oxigênio (vol. %)
A	40	0	0	0	Variável	Variável
B	40	0	4	0	Variável	Variável
C	40	0	0	5	Variável	Variável
D	40	0	0	10	Variável	Variável
E	40	0	0	15	Variável	Variável
F	40	0	0	20	Variável	Variável
G	40	0	0	30	Variável	Variável

Tabela 5. Resumo de Teste de Inflamabilidade de Isopreno

Nº de Série	Temperatura (°C)	Pressão Kg/cm^2 (psig)	Concentração de Vapor (vol. %)	Concentração de Isopreno (vol. %)	Concentração de Oxigênio (vol. %)
1	40	0	0	Variável	Variável
2	40	0	4	Variável	Variável

II. Descrição de modelo de temperatura de chama adiabática calculada (CAFT)

Temperaturas de chamas adiabáticas calculadas (CAFT) junto com uma temperatura de chama limite selecionada para a propragação da combustão são usadas para determinar a curva envelope de inflamabilidade

para o isopreno. O programa computacional usado neste estudo para calcular as temperaturas de chama é o software CEA (Chemical Equilibrium with Applications) do Centro de Pesquisa Glenn da NASA.

Existem cinco etapas envolvidas na determinação da curva envelope da inflamabilidade usando um modelo de temperatura de chama adiabática para um mecanismo de combustão homogêneo (onde tanto o combustível como o comburente estão no estado gasoso): a seleção dos reagentes desejados, seleção da condição de teste, seleção da temperatura de chama limite, modificação dos reagentes e construção de uma curva envelope de inflamabilidade para cálculos.

Nesta primeira etapa, de seleção dos reagentes desejados, deve ser tomada uma decisão quanto às espécies de reagentes que estarão presentes no sistema e às quantidades de cada uma. Em muitos casos, os programas computacionais usados para os cálculos têm uma lista de espécies de reagentes e produtos. Se quaisquer dos dados para as espécies a serem estudadas não são encontrados no programa, eles podem ser obtidos a partir de outras fontes tais como as tabelas JANAF ou a partir da internet. No modelo atual, dados para água, nitrogênio, oxigênio e dióxido de carbono estão presentes na base de dados do programa. A base de dados do programa não tem isopreno como uma espécie; portanto, as propriedades termodinâmicas são incorporadas manualmente.

A próxima etapa é para decidir as condições de temperatura e pressão iniciais em que o processo de combustão está ocorrendo. Neste modelo, a pressão é de 1 atmosfera (absoluta) e a temperatura é de 40°C, o ponto de ebulição do isopreno.

A temperatura de chama limite para combustão pode ser selecionada com base em princípios teóricos ou determinada experimentalmente. Cada método tem suas próprias limitações.

Com base em estudos anteriores, as temperaturas de chamas limites de hidrocarbonetos se encaixam no intervalo de 726,85 a 1226,85°C (1000 K a 1500 K). Para este modelo, o valor de 1226,85°C (1500 K) é selecionado. Esta é a temperatura em que a reação de monóxido de carbono a

dióxido de carbono (uma reação altamente exotérmica e que constitui uma proporção significativa da energia da chama) se torna autossustentável.

Uma vez que se tenha decidido sobre a temperatura de chama limite, cálculos de modelo são realizados na mistura de reagentes determinada (concentrações de espécies) e a temperatura de chama adiabática é determinada. Considera-se que a propagação da chama tenha ocorrido apenas se a temperatura for maior que a temperatura de chama limite. A composição de mistura de reagentes é em seguida modificada para criar conjuntos de dados para misturas de propagação e não propagação.

Este tipo de modelo mostra boa correlação com os limites de inflamabilidade determinados experimentalmente. Regiões fora da curva envelope derivada não são inflamáveis e regiões dentro dela são inflamáveis. O formato da curva envelope forma um nariz. O nariz da curva envelope está relacionado com a concentração limite de oxigênio (CLO) para combustíveis gasosos.

III. Resultados do modelo de temperatura de chama adiabática calculada (CAFT)

Os resultados de modelo CAFT são plotados nas figuras 68 a 74 para as Séries A a G, respectivamente. As figuras plotam a temperatura de chama adiabática calculada (usando o programa CEA da NASA) como uma função da concentração de combustível (em peso) para várias proporções de oxigênio/nitrogênio (em peso). As partes da curva que estão acima de 1226,85°C (1500 K), a temperatura de chama limite selecionada, contêm níveis de combustível suficientes para a propagação da chama. Os resultados podem ser difíceis de interpretar na forma apresentada nas figuras 68 a 74. Adicionalmente, a forma atual não conduz à comparação com dados experimentais o que é geralmente apresentado em termos de porcentual de volume.

Usando a Série A como um exemplo, os dados na figura 68 podem ser plotados na forma de uma curva envelope de inflamabilidade tradicional. Usando a figura 68 e a leitura através da linha de temperatura de 1226,85°C (1500 K) na ordenada uma pessoa pode determinar a concentra-

ção de combustível para esta temperatura de chama limite pela colocação de uma tangente para a abscissa de cada curva (proporção de oxigênio para nitrogênio) com que ela possua interseção. Esses valores podem em seguida ser tabelados como porcentual de peso de combustível para um determinado porcentual de peso de oxidante (figura 75A). Em seguida, tendo conhecimento sobre a composição do combustível (100% em peso de isopreno) e a composição do oxidante (teor relativo de água, oxigênio e nitrogênio) quantidades molares podem ser estabelecidas.

A partir dessas quantidades molares concentrações de volume em porcentagem podem ser calculadas. As concentrações em termos de volume porcentual podem em seguida ser plotadas para gerar uma curva envelope de inflamabilidade (figura 75B). A área delimitada pela curva envelope é o intervalo explosível e a área excluída é o intervalo não explosível. O "nariz" da curva envelope é a concentração limite de oxigênio. As figuras 76A e 76B contêm as concentrações de volume calculadas para a curva envelope de inflamabilidade para a Série B gerada a partir dos dados apresentados na figura 69. Uma abordagem similar pode ser usada nos dados apresentados nas figuras 70-74.

IV. Procedimento e equipamento experimental para testes de inflamabilidade

Testes de inflamabilidade são conduzidos em um vaso de alta pressão de 4 litros. O vaso é de formato cilíndrico com um diâmetro interno de 15 cm (6") e uma altura interna de 22 cm (8,625"). A temperatura do vaso (e os gases dentro dele) é mantida usando aquecedores externos que são controlados por um controlador PID. Para prevenir perdas de calor, lã cerâmica e isolamento reflectivo são embrulhados em torno do vaso de pressão. Termopares tipo K são usados para medir a temperatura do espaço do gás assim como a temperatura do vaso em si. A figura 77 ilustra o vaso de teste.

Antes de um teste ser executado, o vaso é evacuado e limpo com nitrogênio para garantir que quaisquer gases de testes anteriores sejam removidos. Em seguida, o vaso é submetido a vácuo. A pressão após isto ter sido feito está tipicamente em torno de 6 KPa (0,06 bar(a)). Devido à limpeza com nitrogênio, assume-se que o gás responsável por esta pressão inicial

seja o nitrogênio. Usando pressões parciais, água, isopreno, nitrogênio e oxigênio são em seguida adicionados nas quantidades apropriadas para obter as condições de teste em questão. Uma pá de mistura acionada magneticamente dentro do vaso garante a mistura dos conteúdos gasosos. Os gases são misturados por cerca de 2 minutos com a pá sendo desligada aproximadamente 1 minuto antes da ignição.

O dispositivo para iniciar a ignição é compreendido por uma serpentina de nicromo de 1,5 ohm e uma fonte de tensão CA em um circuito de temporizador. Usando um osciloscópio, determina-se que 34,4 VAC são distribuídos ao dispositivo de ignição por 3,2 segundos. Uma corrente máxima de 3,8 amps ocorre aproximadamente no meio do caminho do ciclo de ignição. Assim, a potência máxima é de 131 W e a energia total fornecida no decorrer do ciclo de ignição é de aproximadamente 210 J.

Os dados de deflagração são adquiridos usando um transdutor de pressão Validyne DP215 de relutância variável conectado a um sistema de aquisição de dados. Uma mistura de gás é considerada como deflagradora se a elevação de pressão tiver sido maior que ou igual a 5%.

V. Resultados de testes de inflamabilidade

A primeira série experimental (Série 1) é executada a 40°C e 0 Kg/cm^2 (0 psig) sem vapor. A execução dos testes em diferentes concentrações de isopreno e oxigênio produz a curva de inflamabilidade apresentada na figura 78A. Os pontos de dados mostrados nesta curva são apenas aqueles que delineiam a curva. Uma lista detalhada de todos os pontos de dados tomados para esta série é mostrada nas figuras 80A e 80B.

A figura 78B resume os pontos de dados de explosibilidade mostrados na figura 78A. A figura 78C é uma comparação dos dados experimentais com a curva envelope de inflamabilidade predita do modelo CAFT. O modelo coincide muito bem com os dados experimentais. Discrepâncias podem ser devido à natureza não adiabática da câmara de teste e limitações do modelo. O modelo considera um horizonte temporal infinito para a reação de oxidação e não leva em conta qualquer limitação cinética da reação.

Adicionalmente, o modelo é limitado pelo número de espécies

químicas em equilíbrio que estão em sua base de dados e assim, pode não predizer apropriadamente espécies pirolíticas. Além disso, a curva envelope de inflamabilidade desenvolvida pelo modelo usa um valor para uma temperatura de chama limite 1226,85°C(1500K). A temperatura de chama limite pode estar em um intervalo de valores de 726,85 a 1226,85°C (1.000K a 1.500K) dependendo da espécie química reagente. A natureza complexa de espécies químicas pirolíticas formadas em concentrações de combustível acima do nível de combustível/comburente estequiométrico é uma razão pela qual o modelo pode não predizer com precisão o limite inflamável superior para este sistema.

A segunda série experimental (Série 2) é executada a 40°C e 0 Kg/cm^2 (0 psig) com uma concentração de vapor fixa de 4%. A execução dos testes em diferentes concentrações de isopreno e oxigênio produz a curva de inflamabilidade apresentada na figura 79A. Os pontos de dados mostrados nesta curva são apenas aqueles que delineiam a curva. Uma lista detalhada de todos os pontos de dados tomados para esta série é mostrada na figura 81. Devido à similaridade entre com os dados na Série 1, apenas os pontos essenciais de limite inflamável inferior, concentração limite de oxigênio e limites inflamáveis superiores são testados. A adição de 4% de vapor à mistura em teste não altera significativamente os limites essenciais da curva envelope de inflamabilidade. Deve-se notar que concentrações mais elevadas de vapor/água e ou outras substâncias inertes podem influenciar a curva envelope de inflamabilidade.

A figura 79B resume os pontos de dados de explosibilidade mostrados na figura 79A. A figura 79C é uma comparação dos dados experimentais com a curva envelope de inflamabilidade predita do modelo CAFT. O modelo coincide muito bem com os dados experimentais. Discrepâncias podem ser devido aos mesmos fatores descritos na Série 1.

V. Cálculo de Limites de Inflamabilidade de Isopreno no Ar sob 3 Atmosferas de Pressão

Os métodos descritos no Exemplo 12, partes I a IV também são usados para calcular os limites de inflamabilidade de isopreno em uma pres-

são de sistema absoluta de 3 atmosferas e 40°C. Esses resultados são comparados àqueles do Exemplo 12, partes I a IV em uma pressão de sistema absoluta de 1 atmosfera e 40°C. A pressão mais elevada é testada porque a curva envelope de inflamabilidade se expande ou torna-se maior à medida que pressão de sistema inicial é aumentada. O limite de inflamabilidade superior é o mais afetado, seguido pela composição limite de oxigênio. O limite de inflamabilidade inferior é o menos afetado (veja, por exemplo, "Bulletin 627 – Flammability Characteristics of Combustible Gases e Vapors" escrito por Michael G. Zabetakis e publicado pelo antigo US Bureau of Mines (1965), que é por meio deste incorporada como referência em sua totalidade, em particular com relação ao cálculo de limites de inflamabilidade).

Na figura 82, a temperatura de chama adiabática calculada é plotada como uma função da concentração de isopreno (combustível), expressa em porcentagem de peso do combustível/nitrogênio/oxigênio total, onde a pressão de sistema foi inicialmente de 3 atmosferas. As temperturas de chama calculadas são muito similares àquelas determinadas inicialmente no sistema de 1 atmosfera (figura 83). Como resultado, quando curvas envelopes de inflamabilidade são geradas usando os dados de inflamabilidade adiabática calculada, as curvas são muito similares (veja as figuras 84 e 85). Portanto, com base nesses cálculos teóricos, um aumento de pressão de sistema de uma atmosfera a 3 atmosferas não resulta em um aumento/expansão significativo da curva envelope de inflamabilidade. Se desejado, esses resultados de modelo podem ser validados usando testes experimentais (tal como os testes experimentais aqui descritos em uma pressão de 1 atmosfera).

VII. Resumo de estudos de inflamabilidade

Um modelo temperatura adiabática calculada é desenvolvido para a curva envelope de inflamabilidade do sistema isopreno/oxigênio/ nitrogênio/água/dióxido de carbono a 40°C e 0 Kg/cm^2 (0 psig). O modelo CAFT que é desenvolvido coincide bem com os dados experimentais gerados pelos testes conduzidos neste trabalho. Os resultados experimentais das Séries 1 e 2 validam os resultados do modelo das Séries A e B.

Exemplo 14: Construtos de Expressão e Cepas

Construção de plasmídeos que codificam mevalonato quinase.

A construção que codifica a via inferior do MVA de *Methanosarcina mazei* (Números de acesso NC_003901.1, NC_003901.1, NC_003901.1, e NC_003901.1, que são aqui incorporados, cada um, como referência em suas totalidades) é sintetizada com otimização de códon para a expressão em *E. coli*. Este construto é nomeado operon da Via Inferior de *Archaea* de *M. mazei* (figuras 112A-112C; SEQ ID Nº:102) e codifica as enzimas IDI, IPK, uma descarboxilase putativa e MVK de *M. mazei*. O gene que codifica MVK (Número de acesso NC_003901.1) é amplificado por PCR usando os iniciadores MCM165 e MCM177 (Tabela 11) usando o kit de fusão Herculase II da Strategene de acordo com o protocolo do fabricante usando 30 ciclos com uma temperatura de ligação de 55°C e tempo de extensão de 60 segundos. Este amplicon é purificado usando uma coluna para PCR da Qiagen e em seguida digerido a 37°C em uma reação de 10 µL com PmeI (na presença de tampão NEB 4 e BSA). Após uma hora, NsiI e o tampão H da Roche são adicionados por uma hora adicional a 37°C. O DNA digerido é purificado em uma coluna para PCR da Qiagen e ligado a um plasmídeo digerido e purificado de modo similar MCM29 (MCM29 *E. coli* TOP10 (Invitrogen) transformada com pTrcKudzu codificando isopreno sintase de kudzu) em uma reação de 11uL com 5uL de tampão 1 Quick Ligase da Roche, 1 uL de tampão 2, 1 uL de plasmídeo, 3 uL de amplicon e 1 uL de ligase (1 hora à temperatura ambiente). MCM29 é pTrcKudzuKan. A reação de ligação é introduzida em células TOP10 da Invitrogen e transformantes selecionados em placas LA/kan50 incubadas a 37°C durante a noite. O inserto MVK no plasmídeo resultante MCM382 é sequenciado (figuras 113A-113C; SEQ ID Nº:103).

Tabela 11. Oligonucleotídeos

MCM161	*M.mazei* MVK for	CACCATGGTATCCTGTTCTGCG (SEQ ID Nº: 104)
MCM162	*M.mazei* MVK rev	TTAATCTACTTTCAGACCTTGC (SEQ ID Nº: 105)
MCM165	*M.mazei* MVK for w/ RBS	gcgaacgATGCATaaaggaggtaaaaaaac ATGGTATCCTGTTCTGCGCCGGGTAA GATTTACCTG (SEQ ID Nº: 106)
MCM177	*M.mazei* MVK rev Pst	gggcccgtttaaactttaactagactTTAATCTAC TTTCAGACCT TGC (SEQ ID Nº: 107)

II. Criação de cepas superexpressando mevalonato quinase e isopreno sintase.

O plasmídeo MCM382 é transformado em células MCM331 (que contêm o construto cromossomal gi1.2KKDyI que codifica mevalonato quinase, mevalonato fosfato quinase, mevalonato pirofosfato decarboxilase, e IPP isomerase de *S. cerevisiae*) que tinham sido cultivadas até midlog em meio LB e lavadas três vezes em água gelada, estéril. Um microlitro de DNA é adicionado a 50 µL de suspensão celular e esta mistura é eletroporada em uma cuveta de 2 mm a 2,5 volts, 2,4 C (25 uFd) seguida por imediata recuperação em 500 µL de meio LB por uma hora a 37°C. O transformante foi selecionado em LA/can50 e nomeado MCM391. O plasmídeo MCM82 é introduzido nesta cepa pelo mesmo protocolo de eletroporação seguido pela seleção em LA/can50/espec50. A cepa resultante MCM401 contém um construto cromossomal marcado com cmp gi1.2KKDyI, o plasmídeo MCM382 marcado com can e o plasmídeo MCM82 marcado com espec (que é pCL PtrcUpperPathway codificando mvaE e mvaS de *E. faecalis*). Veja a Tabela 12.

Tabela 12. Cepas superexpressando mevalonato quinase e isopreno sintase

Cepa	Genótipo
MCM382	*E. coli* BL21 (lambdaDE3) pTrcKudzuMVK(M. mazei) GI1.2KKDyI
MCM391	MCM331 pTrcKudzuMVK(*M. mazei*)
MCM401	MCM331pTrcKudzuMVK(*M.mazei*)pCLPtrcUpperpathway
MCM396	MCM333pTrcKudzuMVK(*M. mazei*)
MCM406	MCM333pTrcKudzuMVK(*M.mazei*)pCLPtrcUpperpathway

III. Construção do plasmídeo MCM376 - MVK a partir de Inferior da Archaea *M. mazei* em pET200D.

A ORF de MVK do operon da Via Inferior de *Archaea* de *M. mazei* (figuras 112A-112C; SEQ ID Nº:102) é amplificada por PCR usando os iniciadores MCM161 e MCM162 (Tabela 14-1) usando a mistura do Platinum HiFi PCR da Invitrogen. Quarenta e cinco microlitros da mistura de PCR são combinados com 1 uL de molde, 1 uL de cada iniciador a 10 uM e 2 uL de água. A reação foi submetida à ciclagem como se segue: 94°C por 2:00; 30 ciclos de 94°C por 0:30, 55°C por 0:30; e 68°C por 1:15; e em seguida 72°C por 7:00 e 4°C até o resfriamento. Três microlitros desta reação de PCR são ligados ao plasmídeo pET200D da Invitrogen de acordo com o protocolo do fabricante. Três microlitros desta ligação são introduzidos em células TOP10 da Invitrogen e transformantes são selecionados em LA/can50. Um plasmídeo de um transformante é isolado e o inserto sequenciado, resultando em MCM376 (figuras 114A-114C; SEQ ID Nº:108).

V. Criação da cepa de expressão MCM378.

O plasmídeo MCM376 é transformado em células BL21(DE3) pLysS da Invitrogen de acordo com o protocolo do fabricante. O transformante MCM378 é selecionado em LA/can50.

Exemplo 15: Produção de isopreno por *E. coli* expressando a via inferior integrada do mevalonato (MVA) e a via superior do MVA, mevalonato quinase de *M. mazei* e isopreno sintase de kudzu e cultivada em cultura de batelada alimentada na escala de batelada de 20 mL

Receita do Meio (por litro de meio de fermentação):

Cada litro de meio de fermentação continha: 13,6g de K_2HPO_4, 13,6g de $MgSO_4 * 7H_2O$, 2g de ácido cítrico mono-hidratado, 0,3g de citrato de amônio férrico, 3,2g de $(NH_4)_2SO_4$, 1g de extrato de levedura e 1 mL de solução de metal traço modificada 1000X. Todos os componentes são adicionados e dissolvidos em diH_2O. O pH é ajustado para 6,8 com hidróxido de amônio (30%) e levado ao volume. Os meios foram esterilizados por filtração em filtro de 0,22 mícrons. Glicose (2,5 g),e antibióticos foram adicionados após a esterilização e ajuste de pH.

Solução de Metal Traço 1000X:

A solução de metal traço 1000X continha 40 g de ácidos cítricos * H_2O, 30 g de $MnSO_4$ * H_2O, 10 g de NaCl, 1 g de $FeSO_4$ * $7H_2O$, 1 g de $CoCl_2$ * $6H_2O$, 1 g de $ZnSO_4$ * $7H_2O$, 100 mg de $CuSO_4$ * $5H_2O$, 100 mg de H_3BO_3, 100 mg de $NaMoO_4$ * $2H_2O$. Os componentes são dissolvidos um por vez em diH_2O, pH a 3,0 com HCl/NaOH, em seguida levados ao volume e esterilizados por filtração em filtro de 0,22 mícrons.

Cepas:

Células MCM343 são células de *E. coli* BL21 (DE3) que contêm a via superior do mevalonato (MVA) (pCL Upper), a via inferior do MVA integrada (gi1.2KKDyI) e isopreno sintase de kudzu (pTrcKudzu).

Células MCM401 são células de *E. coli* BL21 (DE3) que contêm a via superior do mevalonato (MVA) (pCL PtrcUpperPathway), a via inferior do MVA integrada (gi1.2KKDyI), e alta expressão de mevalonato quinase de *M. mazei* e isopreno sintase de kudzu (pTrcKudzuMVK (*M. mazei*)).

A produção de isopreno foi analisada através do crescimento das cepas em biorreatores de 100 mL com um volume de trabalho de 20 mL, a uma temperatura de 30°C. Um inóculo de cepa de *E.coli* tirada de um frasco congelado foi semeado em uma placa de ágar LB (com antibióticos) e incubado a 30°C. Uma única colônia foi inoculada em meios e cultivada durante a noite. As bactérias foram diluídas em 20 mL de meios para atingir uma densidade óptica de 0,05 medida a 550 nm. Os biorreatores de 100 mL foram selados e o ar era bombeado através de uma taxa de 8mL/min. A adequada agitação dos meios foi obtida por agitação a 600 rpm utilizando barras de agitação magnética. O gás de escape dos biorreatores foi analisado usando um espectrômetro de massa on-line Hiden HPR-20. Massas correspondentes a isopreno, CO_2 e outros gases que ocorrem naturalmente no ar foram monitoradas. O isopreno acumulado e a produção de CO_2 foram calculados somando-se a concentração (em porcentagem) dos gases respectivos ao longo do tempo. O CO_2 atmosférico foi subtraído do total, a fim de estimar o CO_2 liberado devido à atividade metabólica.

A produção de isopreno a partir de uma cepa expressando a via

do mevalonato completa e isopreno sintase de Kudzu (MCM343) foi comparada com uma cepa que, em adição, superexpressava MVK de *M. mazei* e isopreno sintase de Kudzu (MCM401) em biorreatores de 100 mL. As bactérias foram cultivadas em condições idênticas em meio definido com a glicose como fonte de carbono. A indução da produção de isopreno foi realizada pela adição de isopropil-beta-D-1 tiogalactopiranosídeo (IPTG) para uma concentração final de 100 uM ou 200 uM. Medições de efluentes gasosos revelaram que a cepa superexpressando tanto MVK como isopreno sintase (MCM401) produziu significativamente mais isopreno em comparação com a cepa expressando apenas a via do mevalonato e isopreno sintase de Kudzu (MCM343), conforme mostrado nas figuras 115A-115D. Em 100 uM de indução, a cepa MCM401produziu duas vezes mais isopreno comparada com a cepa MCM343. Em 200 uM de indução com IPTG, a cepa MCM401 produziu 3,4 vezes mais do isopreno, quando comparada com a cepa MCM343. Análise de CO_2 no gás de escape dos biorreatores, que é uma medida da atividade metabólica, indica que a atividade metabólica foi independente da indução de IPTG e produção de isopreno.

Exemplo 16: Produção de isopreno por *E.coli* expressando a via superior do mevalonato (MVA), a via inferior integrada do MVA (gi1.2KKDyI), mevalonato quinase de *M. mazei* e isopreno sintase de kudzu e cultivada em cultura de batelada alimentada na escala de 15 L.

Receita do Meio (por litro de meio de fermentação):

Cada litro de meio de fermentação continha 7,5 g de K_2HPO_4, 2 g de $MgSO_4 * 7H_2O$, 2 g de ácido cítrico mono-hidratado, 0,3 g de citrato de amônio férrico, 0,5 g de extrato de levedura, e 1 ml de solução com traços de Metal modificada 1000X. Todos os componentes foram adicionados e dissolvidos em DI H_2O. Esta solução foi autoclavada. O pH foi ajustado para 7,0 com hidróxido de amônio (30%) e quantidade suficiente para o volume. Dez grams de glicose, 0,1 g de tiamina * HCl, e antibióticos foram adicionados após a esterilização e o ajuste de pH.

Solução de Metal Traço Modificada 1000X:

A solução de metal traço modificada 1000X continha 40 g de á-

cidos cítricos * H_2O, 30 g de $MnSO_4$ * H_2O, 10 g de NaCl, 1 g de $FeSO_4$ * $7H_2O$, 1 g de $CoCl_2$ * $6H_2O$, 1 g de ZnSO4 * $7H_2O$, 100 mg de $CuSO_4$ * $5H_2O$, 100 mg de H_3BO_3 e 100 mg de $NaMoO_4$ * $2H_2O$. Cada componente foi dissolvido um de cada vez em DI H_2O, pH a 3,0 com HCl/NaOH, então quantidade suficiente para o volume e esterilizado por filtração com filtro de 0,22 mícrons.

A fermentação foi realizada em um biorreator de 15 L com células de *E. coli* BL21 (DE3) contendo a via superior do mevalonato (MVA) (pCL PtrcUpperPathway que codifica mvaE e mvaS de *E. faecalis*), a via inferior do MVA integrada (gi1. 2KKDyI que codifica mevalonato quinase, mevalonato fosfato quinase, mevalonato pirofosfato descarboxilase e IPP isomerase de *S. cerevisiae*) e alta expressão de mevalonato quinase de *M. mazei* e isopreno sintase de kudzu (pTrcKudzuMVK(*M. mazei*)). Este experimento foi realizado para monitorar a formação de isopreno a partir de glicose na temperatura de 30°C e pH 7,0 de fermentação desejados. Um inóculo de cepa de *E. coli* tirado de um recipiente congelado é estriado em uma placa de LB ágar (com antibióticos) e incubado a 37°C. Uma única colônia foi inoculada em meio de triptona-extrato de levedura. Após o inóculo ser cultivado até a OD de 1,0, medida a 550 nm, 500 mL foram usados para inocular 5 L de meio celular em um biorreator de 15 L.

A glicose foi adicionada em taxa exponencial até que as células atingissem a fase estacionária. Após este momento, a alimentação de glicose foi diminuída para atender demandas metabólicas. A quantidade total de glicose distribuída ao biorreator durante a fermentação de 68 horas foi de 3,8 kg. A indução foi feita pela adição de isopropil-beta-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG). A concentração de IPTG é levada a 51 uM quando a densidade ótica a 550 nm (OD_{550}) atinge um valor de 9. A concentração de IPTG foi elevada para 88 uM quando a OD_{550} atingiu 149. Adições de IPTG adicionais elevaram a concentração para 119 uM na OD_{550} = 195 e 152 uM na OD_{550} = 210. O perfil da OD_{550} no biorreator ao longo do tempo é apresentado na figura 116. O nível de isopreno no gás de escape do biorreator é determinado usando um espectrômetro de massas Hiden. O título de isopreno aumen-

tou ao longo da fermentação até um valor final de 23,8 g/L (figura 117). A quantidade total de isopreno produzida durante a fermentação de 68 horas foi de 227,2 g e a evolução da produção ao longo do tempo é apresentada na figura 118. O perfil de atividade metabólica, como medido por TCER é mostrado na figura 119. A contagem viável total (unidades formadoras de colônia) diminuiu em duas ordens de grandeza entre 10 e 29 horas de fermentação (figura 120). O rendimento molar do carbono utilizado que entrou na produção de isopreno durante a fermentação é de 13,0%. O rendimento em porcentagem de peso de isopreno a partir da glicose foi de 6,3%.

Exemplo 17: Produção de isopreno por *E.coli* expressando a via superior do mevalonato (MVA), a via inferior integrada do MVA (gi1.2KKDyI), mevalonato quinase de *M. mazei* e isopreno sintase de kudzu e cultivada em cultura de batelada alimentada na escala de 15 L (indução de 2x 100µM de IPTG)

Receita do Meio (por litro de meio de fermentação):

Cada litro de meio de fermentação continha 7,5 g de K_2HPO_4, 2 g de $MgSO_4 * 7H_2O$, 2 g de ácido cítrico mono-hidratado, 0,3 g de citrato de amônio férrico, 0,5 g de extrato de levedura, e 1 mL de solução de metal traço modificada 1000X. Todos os componentes foram adicionados e dissolvidos em DI H_2O. Esta solução foi autoclavada. O pH foi ajustado para 7,0 com hidróxido de amônio (30%) e quantidade suficiente para o volume. Dez gramas de glicose, 0,1 g de tiamina * HCl, e antibióticos foram adicionados após a esterilização e o ajuste de pH.

Solução de Metal Traço Modificada 1000X:

A solução de metal traço modificada 1000X continha 40 g de ácidos cítricos * H_2O, 30 g de $MnSO_4 * H_2O$, 10 g de NaCl, 1 g de $FeSO_4 * 7H_2O$, 1 g de $CoCl_2 * 6H_2O$, 1 g de ZnSO4 * $7H_2O$, 100 mg de $CuSO_4 * 5H_2O$, 100 mg de H_3BO_3 e 100 mg de $NaMoO_4 * 2H_2O$. Cada componente foi dissolvido um de cada vez em DI H_2O, pH a 3,0 com HCl/NaOH, então quantidade suficiente para o volume e esterilizado por filtração com filtro de 0,22 mícrons.

A fermentação foi realizada em um biorreator de 15 L com células de *E. coli* BL21 (DE3) contendo a via superior do mevalonato (MVA) (pCL

PtrcUpperPathway que codifica mvaE e mvaS de *E. faecalis*), a via inferior do MVA integrada (gi1. 2KKDyI que codifica mevalonato quinase, mevalonato fosfato quinase, mevalonato pirofosfato descarboxilase e IPP isomerase de *S. cerevisiae*) e alta expressão de mevalonato quinase de *M. mazei* e isopreno sintase de kudzu (pTrcKudzuMVK(*M. mazei*)). Este experimento foi realizado para monitorar a formação de isopreno a partir de glicose na temperatura de 30°C e pH 7,0 de fermentação desejados. Um inóculo de cepa de *E. coli* tirado de um recipiente congelado é estriado em uma placa de LB ágar (com antibióticos) e incubado a 37°C. Uma única colônia foi inoculada em meio de triptona-extrato de levedura. Após o inóculo ser cultivado até a OD de 1,0, medida a 550 nm, 500 mL foram usados para inocular 5 L de meio celular em um biorreator de 15 L.

A glicose foi adicionada em taxa exponencial até que as células atingissem a fase estacionária. Após este momento, a alimentação de glicose foi diminuída para atender demandas metabólicas. A quantidade total de glicose distribuída ao biorreator durante a fermentação de 55 horas foi de 1,9 kg. A indução foi feita pela adição de isopropil-beta-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG). A concentração de IPTG é levada a 111 uM quando a densidade ótica a 550 nm (OD_{550}) atingiu um valor de 9. A concentração de IPTG foi elevada para 193 uM quando a OD_{550} atingiu 155. O perfil da OD_{550} no biorreator ao longo do tempo é apresentado na figura 121. O nível de isopreno no gás de escape do biorreator foi determinado usando um espectrômetro de massas Hiden. O título de isopreno aumentou ao longo da fermentação até um valor final de 19,5 g/L (figura 122). A quantidade total de isopreno produzida durante a fermentação de 55 horas foi de 133,8 g e a evolução da produção ao longo do tempo é apresentada na figura 123. Níveis de produtividade volumétrica instantânea atingiram valores tão altos quanto 1,5 g de isopreno/L caldo/h (figura 124). Níveis de rendimento instantâneo atingiram tão alto quanto 17,7% p/p (figura 125). O perfil de atividade metabólica, como medido por TCER é mostrado na figura 126. A contagem viável total (unidades formadoras de colônia) diminuiu em duas ordens de grandeza entre 8 e 36 horas de fermentação (figura 127). O rendimento mo-

lar do carbono utilizado que entrou na produção de isopreno durante a fermentação é de 15,8%. O rendimento em porcentagem de peso de isopreno a partir da glicose foi de 7,4%.

Além disso, como controle, a fermentação foi realizada em um biorreator de 15 L com células de *E. coli* BL21 (DE3) contendo a via superior do mevalonato (MVA) (pCL PtrcUpperPathway que codifica mvaE e mvaS de *E. faecalis*), a via inferior do MVA integrada (gi1. 2KKDyl que codifica mevalonato quinase, mevalonato fosfato quinase, mevalonato pirofosfato descarboxilase e IPP isomerase de *S. cerevisiae*) e alta expressão de mevalonato quinase de *M. mazei* e isopreno sintase de kudzu (pTrcKudzuMVK(*M. mazei*)). Este experimento foi realizado para monitorar a atividade metabólica de células não induzidas como medido por CER a partir de glicose na temperatura de 30°C e pH 7,0 de fermentação desejados. Um inóculo de cepa de *E. coli* (MCM401 descrita acima) tirado de um recipiente congelado é estriado em uma placa de LB ágar (com antibióticos) e incubado a 37°C. Uma única colônia foi inoculada em meio de triptona-extrato de levedura. Após o inóculo ser cultivado até a OD de 1,0, medida a 550 nm, 500 mL foram usados para inocular 5 L de meio em um biorreator de 15 L. A glicose foi adicionada em taxa exponencial até que as células atingissem a fase estacionária. Após este momento, a alimentação de glicose foi diminuída para atender demandas metabólicas.

A figura 148 compara os perfis de CER para as células não induzidas descritas acima e as células induzidas pela adição de isopropil-beta-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) nos Exemplos 16 e 17.

<u>Exemplo 18: Produção de isopreno por *E.coli* expressando a via superior do mevalonato (MVA), a via inferior integrada do MVA (gi1.2KKDyl), mevalonato quinase de *M. mazei* e isopreno sintase de kudzu e cultivada em cultura de batelada alimentada na escala de 15 L (indução alimentada de 1x 50µM de IPTG+ 150µM de IPTG)</u>

<u>Receita do Meio (por litro de meio de fermentação):</u>

Cada litro de meio de fermentação continha 7,5 g de K_2HPO_4, 2 g de $MgSO_4 * 7H_2O$, 2 g de ácido cítrico mono-hidratado, 0,3 g de citrato de

amônio férrico, 0,5 g de extrato de levedura, e 1 mL de solução de metal traço modificada 1000X. Todos os componentes foram adicionados e dissolvidos em diH_2O. Esta solução foi autoclavada. O pH foi ajustado para 7,0 com hidróxido de amônio (30%) e quantidade suficiente para o volume. Dez gramas de glicose, 0,1 g de tiamina * HCl, e antibióticos foram adicionados após a esterilização e o ajuste de pH.

Solução de Metal Traço Modificada 1000X:

A solução de metal traço modificada 1000X continha 40 g de ácidos cítricos * H_2O, 30 g de $MnSO_4$ * H_2O, 10 g de NaCl, 1 g de $FeSO_4$ * $7H_2O$, 1 g de $CoCl_2$ * $6H_2O$, 1 g de ZnSO4 * $7H_2O$, 100 mg de $CuSO_4$ * $5H_2O$, 100 mg de H_3BO_3 e 100 mg de $NaMoO_4$ * $2H_2O$. Cada componente foi dissolvido um de cada vez em DI H_2O, pH a 3,0 com HCl/NaOH, então quantidade suficiente para o volume e esterilizado por filtração com filtro de 0,22 mícrons.

A fermentação foi realizada em um biorreator de 15 L com células de *E. coli* BL21 (DE3) contendo a via superior do mevalonato (MVA) (pCL PtrcUpperPathway que codifica mvaE e mvaS de *E. faecalis*), a via inferior do MVA integrada (gi1. 2KKDyI que codifica mevalonato quinase, mevalonato fosfato quinase, mevalonato pirofosfato descarboxilase e IPP isomerase de *S. cerevisiae*) e alta expressão de mevalonato quinase de *M. mazei* e isopreno sintase de kudzu (pTrcKudzuMVK(*M. mazei*)). Este experimento foi realizado para monitorar a formação de isopreno a partir de glicose na temperatura de 30°C e pH 7,0 de fermentação desejados. Um inóculo de cepa de *E. coli* tirado de um recipiente congelado é estriado em uma placa de LB ágar (com antibióticos) e incubado a 37°C. Uma única colônia foi inoculada em meio de triptona-extrato de levedura. Após o inóculo ser cultivado até a OD de 1,0, medida a 550 nm, 500 mL foram usados para inocular 5 L de meio celular em um biorreator de 15 L.

A glicose foi adicionada em taxa exponencial até que as células atingissem a fase estacionária. Após este momento, a alimentação de glicose foi diminuída para atender demandas metabólicas. A quantidade total de glicose distribuída ao biorreator durante a fermentação de 55 horas foi de 2,2

kg. A indução foi feita pela adição de isopropil-beta-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG). A concentração de IPTG é levada a 51 uM quando a densidade ótica a 550 nm (OD_{550}) atingiu um valor de 10. Além do pico de IPTG, na OD_{550} = 10, uma alimentação constante teve início e distribuiu 164 mg de IPTG por 18 horas. O perfil da OD_{550} no biorreator ao longo do tempo é apresentado na figura 128. O nível de isopreno no gás de escape do biorreator foi determinado usando um espectrômetro de massas Hiden. O título de isopreno aumentou ao longo da fermentação até um valor final de 22,0 g/L (figura 129). A quantidade total de isopreno produzida durante a fermentação de 55 horas foi de 170,5 g e a evolução da produção ao longo do tempo é apresentada na figura 130. O perfil de atividade metabólica, como medido por TCER é mostrado na figura 131. Quando o fluxo de ar para o biorreator foi diminuído de 8 slpm para 4 slpm por um período de cerca de 1,7 horas, a concentração de isopreno no gás de escape aumentou de 0,51 para 0,92 p/p% (figura 132). Esses níveis elevados de isopreno não parecem ter qualquer impacto negativo na atividade metabólica celular como medido pela taxa de evolução de dióxido de carbono (TCER), visto que o TCER declinou apenas 7% entre 37,2 e 39,3 horas (figura 132). A contagem viável total (unidades formadoras de colônia) diminuiu em duas ordens de grandeza entre 7 e 36 horas de fermentação (figura 133). O rendimento molar do carbono utilizado que entrou na produção de isopreno durante a fermentação é de 16,6%. O rendimento em porcentagem de peso de isopreno a partir da glicose foi de 7,7%.

Exemplo 19: O efeito de isopreno aplicado externamente no cultivo de *E. coli* selvagem em cultura de batelada alimentada na escala de 1 L

Receita do Meio (por litro de meio de fermentação):

Cada litro de meio de fermentação continha 7,5 g de K_2HPO_4, 2 g de $MgSO_4 * 7H_2O$, 2 g de ácido cítrico mono-hidratado, 0,3 g de citrato de amônio férrico, 0,5 g de extrato de levedura, e 1 mL de solução de metal traço modificada 1000X. Todos os componentes foram adicionados e dissolvidos em diH_2O. Esta solução foi autoclavada. O pH foi ajustado para 7,0 com hidróxido de amônio (30%) e quantidade suficiente para o volume. Dez gra-

mas de glicose, 0,1 g de tiamina * HCl, e antibióticos foram adicionados após a esterilização e o ajuste de pH.

Solução de Metal Traço Modificada 1000X:

A solução de metal traço modificada 1000X continha 40 g de ácidos cítricos * H_2O, 30 g de $MnSO_4$ * H_2O, 10 g de NaCl, 1 g de $FeSO_4$ * $7H_2O$, 1 g de $CoCl_2$ * $6H_2O$, 1 g de ZnSO4 * $7H_2O$, 100 mg de $CuSO_4$ * $5H_2O$, 100 mg de H_3BO_3 e 100 mg de $NaMoO_4$ * $2H_2O$. Cada componente foi dissolvido um de cada vez em DI H_2O, pH a 3,0 com HCl/NaOH, então quantidade suficiente para o volume e esterilizado por filtração com filtro de 0,22 mícrons.

A fermentação foi realizada em um biorreator de 1 L com células de *E. coli* BL21 (DE3). Este experimento foi realizado para monitorar os efeitos do isopreno na viabilidade celular e atividade metabólica em um biorreator de batelada alimentada com glicose na temperatura de 30°C e pH 7,0 de fermentação desejados. Um inóculo de cepa de *E. coli* de um recipiente congelado foi inoculado em meio de triptona-extrato de levedura. Após o inóculo ser cultivado até a OD de 1,0, medida a 550 nm, 50 mL foram usados para inocular 0,5 L de meio em um biorreator de 1 L.

A glicose foi adicionada em taxa exponencial até que as células atingissem a fase estacionária. Após este momento, a alimentação de glicose foi diminuída para atender demandas metabólicas. O isopreno foi adicionado no biorreator usando gás nitrogênio como um veículo. A taxa de alimentação de isopreno foi de 1 g/L/h durante a fase de crescimento intermediária (OD_{550} = 31-44) e durou por um total de 75 minutos (13,2 a 14,4 horas). O perfil da OD_{550} no biorreator ao longo do tempo é apresentado na figura 134. O perfil de atividade metabólica, como medido por TCER é mostrado na figura 135. A contagem viável total (unidades formadoras de colônia) aumentou 14 vezes durante o período que o isopreno foi introduzido no biorreator (figura 136).

Exemplo 20: Produção de Isopreno e expressão de isopreno sintase por *Saccharomyces cerevisiae*

A enzima isopreno sintase kudzu foi otimizada para a expressão

de acordo com uma tabela de uso de códons do híbrido *Saccharomyces cerevisiae/Pichia pastoris*, sintetizada e clonada em pDONR221:19430 (por DNA 2.0, figura 140 para o mapa e figura 141 para a sequência (SEQ ID Nº: 115)). Uma reação de clonagem GATEWAY® (Invitrogen) foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante. Já que pDONR221:19430 era um vetor "vazio", a enzima LR Clonase II (a Reação LR) foi usada para introduzir a isopreno sintase com otimização de códons no vetor "de destino" pYES-DEST52 (Invitrogen).

A reação LR foi em seguida transformada em células quimicamente competentes Top10 (Invitrogen) de acordo com o protocolo do fabricante, e bactérias com os plasmídeos pYES-DEST52 com a ORF de isopreno sintase foram selecionadas em placas de LA contendo 50 µg/mL de carbenicilina. Transformantes positivos individuais foram testados por PCR de colônia (veja abaixo concentrações de iniciadores e parâmetros de termociclagem) usando as microesferas de PCR PuReTaq READY-TO-GO™ (GE Healthcare) com o iniciador T7 direto e o iniciador para isopreno sintase de levedura-Rev2 (Veja a aTabela 13)

Tabela 13. Sequências de iniciadores para amplificar isopreno sintase

Nome do Iniciador	Sequência (5' a 3')	Propósito
Levedura HGS -For2	CACCAAAGACTTCATAGACT (SEQ ID Nº: 116)	Iniciador direto para isopreno sintase otimizada para levedura
Levedura HGS -Rev2	AGAGATATCTTCCTGCTGCT (SEQ ID Nº: 117)	Iniciador reverso para isopreno sintase otimizada para levedura
T7 Direto	TAATACGACTCACTATAGGG (SEQ ID Nº: 118)	Iniciador de PCR e sequenciamento

Plasmídeos que renderam um fragmento de PCR do tamanho correto (1354 bp) foram purificados por miniprep (Qiagen) e enviados para sequenciamento (Quintara Biosciences, Berkeley, CA) com os iniciadores T7 Direto e isopreno sintase de levedura-For2 (Veja a Tabela 13). Resultados

de corridas de sequenciamento são comparados com a sequência conhecida de pDONR221:19430 (usando o software Vetor NTI, Invitrogen), e um único plasmídeo, pDW14 foi selecionado para estudo adicional (figura 142A para o mapa e figuras 142B e C para a sequência completa (SEQ ID Nº:119)). A sequência da isopreno sintase de kudzu de pDW14 diverge daquela de pDONR221:19430 por um único nucleotídeo (marcado em negrito na figura 142B). A alteração de nucleotídeo único (G para A) não resultou em uma alteração na ORF, já que ela está na terceira posição de um códon codificador de lisina.

O pDW14 purificado foi transformado na cepa INVSc-1 de *Saccharomyces cerevisiae* usando o protocolo descrito no kit de transformação S. c. EasyComp (Invitrogen). Cepas INVSc-1 contendo pDW14 ou pYES-DEST52 (que contêm um gene de URA3 intacto) são selecionadas por e mantidas em Meio Mínimo SC com 2% de glicose sem uracila, conforme descrito no manual do Vetor Gateway pYES-DEST52 (Invitrogen). Dois isolados independentes de INVSc-1 contendo pDW14 e uma única cepa controle com pYES-DEST52 são escolhidos para análise adicinal.

Para induzir a expressão de isopreno sintase, culturas são cultivadas durante a noite em Meio Mínimo SC líquido. As culturas são em seguida diluídas para uma OD_{600} de aproximadamente 0,2 e cultivadas por 2-3 horas. As culturas são centrifugadas, lavadas uma vez, ressuspendidas em um volume igual (10 mL) de Meio Mínimo SC com 1% de rafinose, 2% de galactose sem uracila e cultivadas durante a noite para induzir a expressão de isopreno sintase. A OD_{600} das cepas foi determinada (figura 144A) e cepas foram recuperadas por centrifugação e ressuspendidas em 2 mL de tampão de lise (uma mistura 1:1 de 50% de glicerol e PEB pH 7,4: base tris 2,423g/L, $MgCl_2$ (Anidro) 1,904g/L, KCl 14,910g/L, DTT 0,154 g/L, glicerol 50 mL/L).

As misturas de lise são passadas em uma prensa de French três vezes e lisados são analisados por SDS-PAGE. Para a análise de gel de Coomassie (figura 143A), amostras são diluídas 1:1 com tampão de amostra com SDS 2X com agente redutor, carregadas (20 µL de volume total) em um

gel de 4-12% de bis-tris, corridas em tampão MES e coradas usando SimplyBlue SafeStain de acordo com o protocolo do fabricante (o sistema Novex da Invitrogen).

O kit WesternBreeze (Invitrogen) é usado para transferir e detecção cromogênica de isopreno sintase em uma membrana de nitrocelulose. O anticorpo primário é 1799A 10 semanas diluído 1:1000 no diluente de anticorpo da Invitrogen. A ligação de anticorpo primário foi seguida pelo desenvolvimento com um anticorpo secundário marcado com Alexa Fluor 488 (Invitrogen No. do catálogo A-11008) para permitir a determinação de sinal quantitativo. O procedimento de western blot foi realizado como descrito pela Invitrogen. O sinal de fluorescência foi registrado com um instrumento Molecular Dynamics Storm usando o ajuste de filtro azul e analisado quantitativamente com o pacote de *software* para análise de imagens Molecular Dynamics ImageQuant. A atividade específica dos membros da biblioteca foi calculada a partir da razão da quantidade de isopreno produzida dividida pela A600 das culturas de indução ou pela concentração de proteína isopreno sintase determinada por western blot. A figura 143B mostra que a isopreno sintase estava presente nas cepas INVSc-1 induzidas contendo pDW14 (figura 118B, raias 2 e 3) em comparação com o controle contendo pYES-DEST52 (raia 1).

O ensaio DMAPP para *headspace* de isopreno sintase é realizado em 25 µL do lisado de cada cepa para a qual 5 µL de $MgCl_2$ 1 M, 5 µL de DMAPP 100mM e 65 µL de 50 mM de Tris pH 8 foram adicionados. A reação foi realizada a 30°C por 15 minutos em um tubo GC de 1,8 mL com vedação para gás. Reações foram interrompidas pela adição de 100 µL de EDTA a 250 mM (pH 8). A figura 144B mostrou os valores de atividade específica (em µg de HG/L/OD) das cepas induzidas contendo pDW14 em comparação com o controle. Cepas induzidas contendo pDW14 exibem atividade aproximadamente 20X mais alta que o controle que não possui isopreno sintase.

Parâmetros de Ciclagem de PCR

Microesferas de PCR illustra PuReTaq READY-TO-GO™ (GE

Healthcare) foram usadas com pares de iniciador oligonucleotídico em uma concentração de 0,4 µM cada em 25 µL de volume total/reação. Para a análise de plasmídeos resultando da reação de LR Clonase (Invitrogen), uma pequena quantidade de bactérias de colônias individuais em uma placa seletiva é adicionada a cada tubo contendo a mistura de PCR descrita acima. O ciclo de reação foi o seguinte: 1) 95°C – 4 minutos; 2) 95°C – 20 segundos; 3) 52°C – 20 segundos; 4) 72°C – 30 segundos; 5 ciclos das etapas 2 a 4; 5) 95°C – 20 segundos; 6) 55°C – 20 segundos; 7) 72°C – 30 segundos; 25 ciclos das etapas 5 a 7; 72°C – 10 min; e 4°C até o resfriamento.

Exemplo 21: Produção de isopreno em *Pseudomonas* e outras bactérias Gram-negativas

Construção de pBBR5HGSOpt2_2, conjugação em *Pseudomonas* e medição de atividade de isopreno sintase

Um gene codificando isopreno sintase de *Pueraria lobata* (planta kudzu) foi otimizado por códon para diferentes espécies microbianas de interesse (Tabela 14; fluo-opt2v2 foi a sequência escolhida) e foi sintetizado por DNA2.0, Menlo Park, CA. O mapa e a sequência de fluo-opt2v2 podem ser encontrados nas figuras 145A e 145B (SEQ ID Nº: 120). Sítios de restrição de HindIII e BamHI foram adicionados à sequência sintetizada para clonagem mais fácil e um RBS foi adicionado na frente do ATG para acentuar a transcrição.

Número de códons raros, em função das espécies microbianas, em diferentes versões isopreno sintase com códon otimizado de *Pueraria lobata*. Várias rodadas de otimização levaram a um gene sem códons raros em todas as espécies de interesse.

Tabela 14. Número de códons raros

Organismo	fluo-opt1 (cota)	fluo-opt2	fluo-opt3	E. coli opt	fluo-opt2v2
Pseudomonas fluorescens Pf-5	19	X	X	57	0
Phodopseudomonas palustris CGA009	37	13	3	74	0
Pseudomonas putida F1	0	0	0	29	0

Organismo	fluo-opt1 (cota)	fluo-opt2	fluo-opt3	E. coli opt	fluo-opt2v2
Corynebacterium glutamicum (ATCC)	4 (Ser)	0	0	0	0
Pseudomonas fluorescens PfO-1	1 (Val)	0	0	57	0

O gene foi fornecido por DNA2.0 em um vetor de clonagem. O vetor foi digerito com HindIII/BamHI, a banda correspondente ao inserto de interesse foi gel-purificado e religado com pBBR1MCS5 digerido com HindIII/BamHI (Kovach et al, *Gene* 166:175-176, 1995, que é incorporado como referência em sua totalidade, particularmente com relação a pBBR1MCS5), figura 146A para o mapa e 146B e C para a sequência (SEQ ID Nº: 121). Isto resultou no plasmídeo pBBR5HGSOpt2_2 (figura 147A para o mapa e 147B e C para a sequência (SEQ ID Nº: 122)) em que a isopreno sintase foi expressa a partir do promotor lac apresentado em pBBR1MCS5.

O vetor foi transformado e,m *E. coli* S17-1 e conjugado com *Pseudomonas putida* F1 ATCC700007 e *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525. Após a conjugação em LB, a seleção para cepas de *Pseudomonas* contendo plasmídeo em M9 + 16 mM de citrato de sódio + Gentamicina 50 ug/ml. A presença do plasmídeo em cepas assim geradas foi checada por uma preparação de plasmídeos usando o kit da Qiagen (Valencia, CA).

Atividades de isopreno sintase das cepas recombinantes de *P. putida,* pBBR5HGSOpt2_2 *e P. fluorescens* pBBR5HGSOpt2_2, foram ensaiadas pelo crescimento das cepas em meio de TM3 (como descrito no Exemplo 1 da parte II) + 10 g/L de glicose, coletando a biomassa em fase log intermediária, quebrando as células pela prensa francesa e prosseguindo com o teste DMAPP. Os resultados do ensaio foram apresentados na Tabela 15. A presença de atividade medida pelo ensaio DMAPP confirmou que a isopreno sintase foi expressa em *Pseudomonas*.

A atividade de isopreno sintase foi examinada em *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas fluorescens* expressando isopreno sintase a partir do promotor lac, usando o plasmídeo pBBR5HGSOpt2_2.

Tabela 15. Atividade de isopreno sintase em *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas fluorescens.*

Cepa	OD	Atividade de isopreno sintase mg de isopreno/(L.h.OD)
P. fluorescens, pBBR5HGSOpt2_2	1,46	0,96
P. putida, pBBR5HGSOpt2_2	3,44	0,65
Controle (*P. putida* s/ plasmídeo)	8,32	A ser determinado

Exemplo 22: Crescimento de cepas de *E. coli* e *Pseudomonas* em cana-de-açúcar comparada com glicose e expressão de isopreno sintase usando os dois substratos

I. Preparação de cana-de-açúcar líquida

Açúcar de cana bruto cristalizado foi dissolvido em água, da seguinte forma: 750 g de H_2O foram adicionados a 250 g de açúcar. A solução foi agitada e aquecida suavemente até a dissolução. Alguns materiais não eram solúveis. O peso da solução foi ajustado para 1 kg, após dissolução para repor a água evaporada. O volume da solução foi medido a 940 mL. Daí a concentração da solução era de 265 g/L. O rótulo do produto reclamava 14 g de carboidratos para 15 g de açúcar de cana bruto. Daí a concentração de carboidratos solúveis da solução foi de 248 g/L. Sólidos secos foram medidos a 24,03%, perto o suficiente do esperado de 250 g/kg. O pH da solução foi de 5,49. A concentração de glicose foi medida usando um teste enzimático/espectrofotométrico, com glicose oxidase. A concentração de glicose foi de 17,4 g/L.

Como a maioria dos micro-organismos não usam a sacarose, mas podem usar a glicose e frutose, a solução foi dividida em duas. Uma metade foi autoclavada uma vez por 30 minutos (cana-de-açúcar como é). Algumas inversões resultaram, visto que o teor de glicose aumentou para 29,75 g/L (Veja a figura 149). A outra metade da solução foi ajustada ao pH 4,0 com ácido fosfórico, então a solução foi invertida por autoclave (açúcar de cana invertido). Três ciclos de 30 minutos foram suficientes para obter a inversão completa, conforme mostrado na figura 149. Ambas as soluções foram utilizadas para as curvas de crescimento descritas a seguir.

II. Curvas de crescimento de diferentes cepas de *E. coli* e *Pseudomonas* em cana-de-açúcar em relação à glicose

Uma colônia de cada uma das cepas apresentadas na Tabela 16 foi inoculada em 25 ml de TM3 + 10 g/L de glicose, e foi cultivada durante a noite a 30°C e 200 rpm. TM3 é descrito no Exemplo 7, Seção II. Na manhã seguinte, 1 ml de cada cultura foi utilizado para inocular frascos contendo 25 mL de TM3 e 10 g/L de glicose, 10 g/L de cana-de-açúcar como é, ou 10 g/L de açúcar de cana invertido (soluções de açúcar de cana descritas acima). Os frascos foram incubados a 30°C e 200 rpm e as amostras foram tiradas regularmente para medir a OD600. As figuras 150 e 151 mostram que a taxa de crescimento e produção de biomassa foram comparáveis para a glicose e açúcar de cana invertido, tanto para as cepas de *E. coli* como as de *Pseudomonas*. *P. fluorescens* mostrou alguns sinais de ser capaz de utilizar um açúcar de cana que não foi invertido também.

Tabela 16. Cepas usadas neste estudo

	Cepa
Escherichia coli	BL21
	MG1655
	ATCC11303
	B REL 606
Pseudomonas	*putida* F1 (ATCC700007)
	Fluorescens (ATCC13525)

III. Comparação da produção de isopreno de *E. coli* expressando isopreno sintase quando cultivada em glicose ou cana-de-açúcar

E. coli MCM401 (BL21 (DE3)) contendo a via completa do MVA, mevalonato quinase de *M. mazei* e isopreno sintase de *Pueraria lobata*, conforme descrito no Exemplo 14, Seção II, foi cultivada em TM3 + 10 g/L de glicose ou 10 g/L de açúcar de cana invertido (com base na concentração de carboidratos solúveis do xarope). Frascos foram inoculados a partir de uma cultura cultivada durante a noite em TM3 + 10 g/L de glicose em uma OD_{600} = 0,2. Os antibióticos foram adicionados, quando necessário. Após duas horas, as culturas de *E. coli* foram induzidas com 400 mM de IPTG. Após 6

horas de crescimento, a produção de isopreno e atividades de isopreno sintase, utilizando o ensaio DMAPP como descrito no Exemplo 2B, foram medidas. Os resultados são apresentados na Tabela 17 e mostram claramente que o açúcar de cana invertido é equivalente à glicose em termos de produção de isopreno e isopreno sintase em uma base por célula.

Tabela 17

Cepa	Fonte de Carbono	OD	Atividade de isopreno sintase mg de isopreno /(L.h.OD)	Produção de isoprene mg de isopreno/ (L.h.OD)
MCM401	Glicose	2,20	21,06	8,98
MCM401	Açúcar de cana invertido	2,32	20,20	9,23

A menos que definido de outro modo, os significados de todos os termos técnicos e científicos aqui utilizados são aqueles comumente entendidos por alguém versado na técnica a que esta invenção pertence. Singleton, *et al.*, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York (1994), e Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology, Harper Perennial, N.Y. (1991) provêem alguém versado na técnica com um dicionário geral de muitos dos termos utilizados nesta invenção. Entenda-se que esta invenção não está limitada à metodologia, protocolos e reagentes particulares descritos, já que estes podem variar. Alguém versado na técnica também apreciará que quaisquer métodos e materiais similares ou equivalentes àqueles aqui descritos também podem ser usados para praticar ou testar a invenção.

Os tópicos aqui fornecidos não são limitações dos vários aspectos ou modalidades da invenção que podem ser tomados como referência ao relatório descritivo como um todo.

Para utilização aqui, salvo clara indicação em contrário, o uso dos termos "um", "uma" e semelhantes se refere a um(a) ou mais.

Referência a "cerca de" um valor ou parâmetro aqui inclui (e descreve) modalidades que são direcionadas àquele valor ou parâmetro por si. Por exemplo, descrição que se refere a "cerca de X" inclui a descrição de "X". Intervalos numéricos incluem os números que definem o intervalo.

Entende-se que aspectos e modalidades da invenção aqui descrita incluem "compreender", "consistir" e "consistir essencialmente em" aspectos e modalidades.

Exemplo 23: Produção de etileno em *E. coli*

I. Construção de uma cepa de *E. coli* produtora de etileno

O produto do gene da enzima formadora de etileno (*efe*) de *Pseudomonas syringae* converte 2-oxoglutarato, um intermediário do ciclo de TCA, em etileno. Os iniciadores que amplificam o gene *efe* bacteriano foram derivados do gene *efe* de *Pseudomonas syringae pv. glycinea* cepa ICMP2189 (Acc.No. EF175870). O gene *efe* foi amplificado por PCR usando par de iniciador efe_rev 5' CGGACCGTCATGAGCCTGTCGCGCGGG-3' (SEQ ID Nº: 127), em que TCA = códon de parada de *efe*-gene, e efe-Pffh_oe: 5'-CCACCCCAGGCGAGAGACAATGACCAACCTACAGACTTTC-3' (SEQ ID Nº: 128), em que ATG = códon de início de gene *efe*, dando o fragmento de PCR A. O DNA genômico preparado a partir de *Pseudomonas syringae* serviu como molde.

A região promotora putativa do gene *ffh* de *E. coli* MG1655 codificando o componente proteico da partícula de reconhecimento do sinal foi amplificada por PCR usando o par de iniciadores Pffh_fwd: 5'-CGGTCCG GAAAGAGAAGCAGTATAGCG-3 '(SEQ ID Nº:129) e Pffh_oe: 5' –GAAA GTCTGTAGGTTGGTCATTGTCTCTCGCCTGGGGTGG-3 '(SEQ ID Nº:130), onde CAT = códon de início de ffh gene, para dar o fragmento de PCR B. O fragmento de PCR B abrange 147 pb a montante do códon de início do gene *ffh* e, assim, o putativo promotor de *ffh*. Os fragmentos de PCR A e B foram excisados pela sobreposição de extensão dePCR gerando um fragmento de DNA que codifica o gene *efe* sob o controle do promotor de *ffh*. Depois da excisão dos fragmentos de PCR A e B usando o par de iniciadores Pffh_fwd e efe_rev, o produto de PCR com extremidades cegas foi clonado em vetor pCR-zero-blunt (Invitrogen) para dar o plasmídeo pCR-blunt_Pffh-efe (SEQ ID 1x, figuras 152A e 152B).

II. Produção de etileno por *E. coli*

E. coli DH5α, pCRblunt-Pffh-efe foi inoculada em 5 ml de LB +

50 ppm de canamicina e incubada durante a noite a 30°C e 200 rpm. Na manhã seguinte, foi inoculada em meio HM1, pH 6,8 (Tabela 1x), contendo 10 g/L de glicose e 1 g/L de extrato de levedura, a uma OD600 de 0,1. A cultura foi incubada a 30°C e 200 rpm. Após 3 h de incubação, 4 X 1 ml e 4 x 5 ml da cultura foram transferidos para um frasco *headspace* de 20 ml selado com uma tampa de teflon. Após 7,5 h de incubação, um outro conjunto de 4 X 5 mL da cultura foi transferido para um frasco *headspace* de 20 ml selado com uma tampa de teflon. Os frascos foram incubados a 30°C e agitação de 200 rpm. Em intervalos regulares de tempo, um frasco foi retirado e analisado para concentração de etileno no *headspace*, OD600 e ácidos orgânicos.

Tabela 1x: Composição de meio HM1

Compostos	Concentração (g/L)
K_2HPO_4	13,6
KH_2PO_4	13,6
$MgSO_4 * 7H_2O$	2
Ácido Cítrico Mono-hidratado	2
Citrato Férrico e de Amônio	0,3
$(NH_4)_2SO_4$	3,2
Solução de metal traço	1 ml

O etileno foi medido pela análise GC/FID com um instrumento Agilent 7890 GC equipado com um amostrador automático CTC PAL "headspace". A coluna GC era uma coluna GS-GasPro (30 m x 0,25 mm x 1 um) conectada a um detector FID. O gás de arraste era hélio a uma vazão de 1,076 mL/min (28,8 cm/seg) com a porta injetora operada em razão de separação de 20:1, e o detector FID mantido a 260°C. Amostras *headspace* (100 uL/injeção) foram retiradas de frascos de vidro de 20mL e analisadas utilizando um programa isotérmico, com uma temperatura do forno regulada em 90°C durante o tempo de execução de 5 min. O método foi calibrado com 100 ppm de etileno em mistura de gases padrão de nitrogênio obtido de Scott Specialty Gases (PA, USA).

Ácidos orgânicos foram analisados por HPLC (coluna de exclusão iônica Aminex HPX-87H, 300 mm X 7,8 mm, 0,005 M H_2SO_4, 0,6 mL/min

como a fase móvel). O succinato não poderia ser detectado por este método já que o pico interferiu com um componente no meio.

As figuras 153, 154 e 155 apresentam concentração de etileno (mg/L de *headspace*), OD, glicose (g/L), acetato (g/L) e lactato (g/L) para os três conjuntos de incubação de frascos *headspace* (figura 153: 5 mL de caldo na OD 0,23; figura 154: 1 mL de caldo na OD 0,23; figura 155: 5 mL de caldo na OD 0,45). Não foi detectado etileno em frascos controle contendo *E. coli* DH5α apenas, com caldo transferido para os frascos de mesma OD e incubado durante o mesmo período de tempo.

III. Recuperação de etileno do *headspace*

O etileno foi recuperado usando adsorção em uma argila montmorilonita modificada por prata, como descrito por Cho *et al.* (*Korean J. Chem. Eng.* (2002) **19**(5), 821-826.). O gás de escape da fermentação foi desumidificado e posto em um filtro de argila modificada por prata (Cho (2002)) para remover o etileno do fluxo de gás de escape. O fluxo de gás de escape pode ser ainda tratado antes da sua introdução no filtro de prata-argila através do qual o dióxido de carbono é eliminado do fluxo de gás de escape por pulverização através de uma solução aquosa de hidróxido de sódio. O etileno foi dessorvido do filtro de prata-argila usando um ciclo de oscilação de pressão, como descrito por Cho *et al.*

Apêndice 1

Ácidos nucleicos e polipeptídeos exemplares de 1-desóxi-D-xilulose-5-fosfato sintase

ATH: AT3G21500(DXPS1) AT4G15560(CLA1) AT5G11380(DXPS3)

OSA: 4338768 4340090 4342614

CME: CMF089C

PFA: MAL13P1.186

TAN: TA20470

TPV: TP01_0516

ECO: b0420(dxs)

ECJ: JW0410(dxs)

ECE: Z0523(dxs)

ECS: ECs0474

ECC: c0531(dxs)

ECI: UTI89_C0443(dxs)

ECP: ECP_0479

ECV: APECO1_1590(dxs)

ECW: EcE24377A_0451(dxs)

ECX: EcHS_A0491

STY: STY0461(dxs)

STT: t2441(dxs)

SPT: SPA2301(dxs)

SEC: SC0463(dxs)

STM: STM0422(dxs)

YPE: YPO3177(dxs)

YPK: y1008(dxs)

YPM: YP_0754(dxs)

YPA: YPA_2671

YPN: YPN_0911

YPP: YPDSF_2812

YPS: YPTB0939(dxs)

YPI: YpsIP31758_3112(dxs)

SFL: SF0357(dxs)

SFX: S0365(dxs)

SFV: SFV_0385(dxs)

SSN: SSON_0397(dxs)

SBO: SBO_0314(dxs)

SDY: SDY_0310(dxs)

ECA: ECA1131(dxs)

PLU: plu3887(dxs)

BUC: BU464(dxs)

BAS: BUsg448(dxs)

WBR: WGLp144(dxs)

SGL: SG0656

KPN: KPN_00372(dxs)
BFL: Bfl238(dxs)
BPN: BPEN_244(dxs)
HIN: HI1439(dxs)
HIT: NTHI1691(dxs)
HIP: CGSHiEE_04795
HIQ: CGSHiGG_01080
HDU: HD0441(dxs)
HSO: HS_0905(dxs)
PMU: PM0532(dxs)
MSU: MS1059(dxs)
APL: APL_0207(dxs)
XFA: XF2249
XFT: PD1293(dxs)
XCC: XCC2434(dxs)
XCB: XC_1678
XCV: XCV2764(dxs)
XAC: XAC2565(dxs)
XOO: XOO2017(dxs)
XOM: XOO_1900(XOO1900)
VCH: VC0889
VVU: VV1_0315
VVY: VV0868
VPA: VP0686
VFI: VF0711
PPR: PBPRA0805
PAE: PA4044(dxs)
PAU: PA14_11550(dxs)
PAP: PSPA7_1057(dxs)
PPU: PP_0527(dxs)
PST: PSPTO_0698(dxs)
PSB: Psyr_0604

PSP: PSPPH_0599(dxs)
PFL: PFL_5510(dxs)
PFO: Pfl_5007
PEN: PSEEN0600(dxs)
PMY: Pmen_3844
PAR: Psyc_0221(dxs)
PCR: Pcryo_0245
ACI: ACIAD3247(dxs)
SON: SO_1525(dxs)
SDN: Sden_2571
SFR: Sfri_2790
SAZ: Sama_2436
SBL: Sbal_1357
SLO: Shew_2771
SHE: Shewmr4_2731
SHM: Shewmr7_2804
SHN: Shewana3_2901
SHW: Sputw3181_2831
ILO: IL2138(dxs)
CPS: CPS_1088(dxs)
PHA: PSHAa2366(dxs)
PAT: Patl_1319
SDE: Sde_3381
PIN: Ping_2240
MAQ: Maqu_2438
MCA: MCA0817(dxs)
FTU: FTT1018c(dxs)
FTF: FTF1018c(dxs)
FTW: FTW_0925(dxs)
FTL: FTL_1072
FTH: FTH_1047(dxs)
FTA: FTA_1131(dxs)

FTN: FTN_0896(dxs)
NOC: Noc_1743
AEH: Mlg_1381
HCH: HCH_05866(dxs)
CSA: Csal_0099
ABO: ABO_2166(dxs)
AHA: AHA_3321(dxs)
BCI: BCI_0275(dxs)
RMA: Rmag_0386
VOK: COSY_0360(dxs)
NME: NMB1867
NMA: NMA0589(dxs)
NMC: NMC0352(dxs)
NGO: NGO0036
CVI: CV_2692(dxs)
RSO: RSc2221(dxs)
REU: Reut_A0882
REH: H16_A2732(dxs)
RME: Rmet_2615
BMA: BMAA0330(dxs)
BMV: BMASAVP1_1512(dxs)
BML: BMA10299_1706(dxs)
BMN: BMA10247_A0364(dxs)
BXE: Bxe_B2827
BUR: Bcep18194_B2211
BCN: Bcen_4486
BCH: Bcen2424_3879
BAM: Bamb_3250
BPS: BPSS1762(dxs)
BPM: BURPS1710b_A0842(dxs)
BPL: BURPS1106A_A2392(dxs)
BPD: BURPS668_A2534(dxs)

BTE: BTH_II0614(dxs)

BPE: BP2798(dxs)

BPA: BPP2464(dxs)

BBR: BB1912(dxs)

RFR: Rfer_2875

POL: Bpro_1747

PNA: Pnap_1501

AJS: Ajs_1038

MPT: Mpe_A2631

HAR: HEAR0279(dxs)

MMS: mma_0331

NEU: NE1161(dxs)

NET: Neut_1501

NMU: Nmul_A0236

EBA: ebA4439(dxs)

AZO: azo1198(dxs)

DAR: Daro_3061

TBD: Tbd_0879

MFA: Mfla_2133

HPY: HP0354(dxs)

HPJ: jhp0328(dxs)

HPA: HPAG1_0349

HHE: HH0608(dxs)

HAC: Hac_0968(dxs)

WSU: WS1996

TDN: Tmden_0475

CJE: Cj0321(dxs)

CJR: CJE0366(dxs)

CJJ: CJJ81176_0343(dxs)

CJU: C8J_0298(dxs)

CJD: JJD26997_1642(dxs)

CFF: CFF8240_0264(dxs)

CCV: CCV52592_1671(dxs) CCV52592_1722

CHA: CHAB381_1297(dxs)

CCO: CCC13826_1594(dxs)

ABU: Abu_2139(dxs)

NIS: NIS_0391(dxs)

SUN: SUN_2055(dxs)

GSU: GSU0686(dxs-1) GSU1764(dxs-2)

GME: Gmet_1934 Gmet_2822

PCA: Pcar_1667

PPD: Ppro_1191 Ppro_2403

DVU: DVU1350(dxs)

DVL: Dvul_1718

DDE: Dde_2200

LIP: LI0408(dsx)

DPS: DP2700

ADE: Adeh_1097

MXA: MXAN_4643(dxs)

SAT: SYN_02456

SFU: Sfum_1418

PUB: SAR11_0611(dxs)

MLO: mlr7474

MES: Meso_0735

SME: SMc00972(dxs)

ATU: Atu0745(dxs)

ATC: AGR_C_1351

RET: RHE_CH00913(dxs)

RLE: RL0973(dxs)

BME: BMEI1498

BMF: BAB1_0462(dxs)

BMS: BR0436(dxs)

BMB: BruAb1_0458(dxs)

BOV: BOV_0443(dxs)

BJA: bll2651(dxs)

BRA: BRADO2161(dxs)

BBT: BBta_2479(dxs)

RPA: RPA0952(dxs)

RPB: RPB_4460

RPC: RPC_1149

RPD: RPD_4305

RPE: RPE_1067

NWI: Nwi_0633

NHA: Nham_0778

BHE: BH04350(dxs)

BQU: BQ03540(dxs)

BBK: BARBAKC583_0400(dxs)

CCR: CC_2068

SIL: SPO0247(dxs)

SIT: TM1040_2920

RSP: RSP_0254(dxsA) RSP_1134(dxs)

JAN: Jann_0088 Jann_0170

RDE: RD1_0101(dxs) RD1_0548(dxs)

MMR: Mmar10_0849

HNE: HNE_1838(dxs)

ZMO: ZMO1234(dxs) ZMO1598(dxs)

NAR: Saro_0161

SAL: Sala_2354

ELI: ELI_12520

GOX: GOX0252

GBE: GbCGDNIH1_0221 GbCGDNIH1_2404

RRU: Rru_A0054 Rru_A2619

MAG: amb2904

MGM: Mmc1_1048

SUS: Acid_1783

BSU: BG11715(dxs)

BHA: BH2779

BAN: BA4400(dxs)

BAR: GBAA4400(dxs)

BAA: BA_4853

BAT: BAS4081

BCE: BC4176(dxs)

BCA: BCE_4249(dxs)

BCZ: BCZK3930(dxs)

BTK: BT9727_3919(dxs)

BTL: BALH_3785(dxs)

BLI: BL01523(dxs)

BLD: BLi02598(dxs)

BCL: ABC2462(dxs)

BAY: RBAM_022600

BPU: BPUM_2159

GKA: GK2392

GTN: GTNG_2322

LMO: lmo1365(tktB)

LMF: LMOf2365_1382(dxs)

LIN: lin1402(tktB)

LWE: lwe1380(tktB)

LLA: L108911(dxsA) L123365(dxsB)

LLC: LACR_1572 LACR_1843

LLM: llmg_0749(dxsB)

SAK: SAK_0263

LPL: lp_2610(dxs)

LJO: LJ0406

LAC: LBA0356

LSL: LSL_0209(dxs)

LGA: LGAS_0350

STH: STH1842

CAC: CAC2077 CA_P0106(dxs)

CPE: CPE1819

CPF: CPF_2073(dxs)

CPR: CPR_1787(dxs)

CTC: CTC01575

CNO: NT01CX_1983

CTH: Cthe_0828

CDF: CD1207(dxs)

CBO: CBO1881(dxs)

CBA: CLB_1818(dxs)

CBH: CLC_1825(dxs)

CBF: CLI_1945(dxs)

CKL: CKL_1231(dxs)

CHY: CHY_1985(dxs)

DSY: DSY2348

DRM: Dred_1078

PTH: PTH_1196(dxs)

SWO: Swol_0582

CSC: Csac_1853

TTE: TTE1298(dxs)

MTA: Moth_1511

MPE: MYPE730

MGA: MGA_1268(dxs)

MTU: Rv2682c(dxs1) Rv3379c(dxs2)

MTC: MT2756(dxs)

MBO: Mb2701c(dxs1) Mb3413c(dxs2)

MLE: ML1038(dxs)

MPA: MAP2803c(dxs)

MAV: MAV_3577(dxs)

MSM: MSMEG_2776(dxs)

MMC: Mmcs_2208

CGL: NCgl1827(cgl1902)

CGB: cg2083(dxs)

CEF: CE1796

CDI: DIP1397(dxs)

CJK: jk1078(dxs)

NFA: nfa37410(dxs)

RHA: RHA1_ro06843

SCO: SCO6013(SC1C3.01) SCO6768(SC6A5.17)

SMA: SAV1646(dxs1) SAV2244(dxs2)

TWH: TWT484

TWS: TW280(Dxs)

LXX: Lxx10450(dxs)

CMI: CMM_1660(dxsA)

AAU: AAur_1790(dxs)

PAC: PPA1062

TFU: Tfu_1917

FRA: Francci3_1326

FAL: FRAAL2088(dxs)

ACE: Acel_1393

SEN: SACE_1815(dxs) SACE_4351

BLO: BL1132(dxs)

BAD: BAD_0513(dxs)

FNU: FN1208 FN1464

RBA: RB2143(dxs)

CTR: CT331(dxs)

CTA: CTA_0359(dxs)

CMU: TC0608

CPN: CPn1060(tktB_2)

CPA: CP0790

CPJ: CPj1060(tktB_2)

CPT: CpB1102

CCA: CCA00304(dxs)

CAB: CAB301(dxs)

CFE: CF0699(dxs)

PCU: pc0619(dxs)

TPA: TP0824

TDE: TDE1910(dxs)

LIL: LA3285(dxs)

LIC: LIC10863(dxs)

LBJ: LBJ_0917(dxs)

LBL: LBL_0932(dxs)

SYN: sll1945(dxs)

SYW: SYNW1292(Dxs)

SYC: syc1087_c(dxs)

SYF: Synpcc7942_0430

SYD: Syncc9605_1430

SYE: Syncc9902_1069

SYG: sync_1410(dxs)

SYR: SynRCC307_1390(dxs)

SYX: SynWH7803_1223(dxs)

CYA: CYA_1701(dxs)

CYB: CYB_1983(dxs)

TEL: tll0623

GVI: gll0194

ANA: alr0599

AVA: Ava_4532

PMA: Pro0928(dxs)

PMM: PMM0907(Dxs)

PMT: PMT0685(dxs)

PMN: PMN2A_0300

PMI: PMT9312_0893

PMB: A9601_09541(dxs)

PMC: P9515_09901(dxs)

PMF: P9303_15371(dxs)

PMG: P9301_09521(dxs)

PMH: P9215_09851

PMJ: P9211_08521

PME: NATL1_09721(dxs)

TER: Tery_3042

BTH: BT_1403 BT_4099

BFR: BF0873 BF4306

BFS: BF0796(dxs) BF4114

PGI: PG2217(dxs)

CHU: CHU_3643(dxs)

GFO: GFO_3470(dxs)

FPS: FP0279(dxs)

CTE: CT0337(dxs)

CPH: Cpha266_0671

PVI: Cvib_0498

PLT: Plut_0450

DET: DET0745(dxs)

DEH: cbdb_A720(dxs)

DRA: DR_1475

DGE: Dgeo_0994

TTH: TTC1614

TTJ: TTHA0006

AAE: aq_881

TMA: TM1770

PMO: Pmob_1001

Ácidos nucleicos e polipeptídeos exemplares de acetil-CoA-acetiltransferase

HSA: 38(ACAT1) 39(ACAT2)

PTR: 451528(ACAT1)

MCC: 707653(ACAT1) 708750(ACAT2)

MMU: 110446(Acat1) 110460(Acat2)

RNO: 25014(Acat1)

CFA: 484063(ACAT2) 489421(ACAT1)

GGA: 418968(ACAT1) 421587(RCJMB04_34i5)

XLA: 379569(MGC69098) 414622(MGC81403) 414639(MGC81256)

444457(MGC83664)
XTR: 394562(acat2)
DRE: 30643(acat2)
SPU: 759502(LOC759502)
DME: Dmel_CG10932 Dmel_CG9149
CEL: T02G5.4 T02G5.7 T02G5.8(kat-1)
ATH: AT5G48230(ACAT2/EMB1276)
OSA: 4326136 4346520
CME: CMA042C CME087C
SCE: YPL028W(ERG10)
AGO: AGOS_ADR165C
PIC: PICST_31707(ERG10)
CAL: CaO19.1591(erg10)
CGR: CAGL0L12364g
SPO: SPBC215.09c
MGR: MGG_01755 MGG_13499
ANI: AN1409.2
AFM: AFUA_6G14200 AFUA_8G04000
AOR: AO090103000012 AO090103000406
CNE: CNC05280
UMA: UM03571.1
DDI: DDB_0231621
PFA: PF14_0484
TET: TTHERM_00091590 TTHERM_00277470 TTHERM_00926980
TCR: 511003.60
ECO: b2224(atoB)
ECJ: JW2218(atoB) JW5453(yqeF)
ECE: Z4164(yqeF)
ECS: ECs3701
ECC: c2767(atoB) c3441(yqeF)
ECI: UTI89_C2506(atoB) UTI89_C3247(yqeF)
ECP: ECP_2268 ECP_2857

ECV: APECO1_3662(yqeF) APECO1_4335(atoB) APECO1_43352(atoB)

ECX: EcHS_A2365

STY: STY3164(yqeF)

STT: t2929(yqeF)

SPT: SPA2886(yqeF)

SEC: SC2958(yqeF)

STM: STM3019(yqeF)

SFL: SF2854(yqeF)

SFX: S3052(yqeF)

SFV: SFV_2922(yqeF)

SSN: SSON_2283(atoB) SSON_3004(yqeF)

SBO: SBO_2736(yqeF)

ECA: ECA1282(atoB)

ENT: Ent638_3299

SPE: Spro_0592

HIT: NTHI0932(atoB)

XCC: XCC1297(atoB)

XCB: XC_2943

XCV: XCV1401(thlA)

XAC: XAC1348(atoB)

XOO: XOO1881(atoB)

XOM: XOO_1778(XOO1778)

VCH: VCA0690

VCO: VC0395_0630

VVU: VV2_0494 VV2_0741

VVY: VVA1043 VVA1210

VPA: VPA0620 VPA1123 VPA1204

PPR: PBPRB1112 PBPRB1840

PAE: PA2001(atoB) PA2553 PA3454 PA3589 PA3925

PAU: PA14_38630(atoB)

PPU: PP_2051(atoB) PP_2215(fadAx) PP_3754 PP_4636

PPF: Pput_2009 Pput_2403 Pput_3523 Pput_4498

PST: PSPTO_0957(phbA-1) PSPTO_3164(phbA-2)

PSB: Psyr_0824 Psyr_3031

PSP: PSPPH_0850(phbA1) PSPPH_2209(phbA2)

PFL: PFL_1478(atoB-2) PFL_2321 PFL_3066 PFL_4330(atoB-2) PFL_5283

PFO: Pfl_1269 Pfl_1739 Pfl_2074 Pfl_2868

PEN: PSEEN3197 PSEEN3547(fadAx) PSEEN4635(phbA)

PMY: Pmen_1138 Pmen_2036 Pmen_3597 Pmen_3662 Pmen_3820

PAR: Psyc_0252 Psyc_1169

PCR: Pcryo_0278 Pcryo_1236 Pcryo_1260

PRW: PsycPRwf_2011

ACI: ACIAD0694 ACIAD1612 ACIAD2516(atoB)

SON: SO_1677(atoB)

SDN: Sden_1943

SFR: Sfri_1338 Sfri_2063

SAZ: Sama_1375

SBL: Sbal_1495

SBM: Shew185_1489

SBN: Sbal195_1525

SLO: Shew_1667 Shew_2858

SPC: Sputcn32_1397

SSE: Ssed_1473 Ssed_3533

SPL: Spea_2783

SHE: Shewmr4_2597

SHM: Shewmr7_2664

SHN: Shewana3_2771

SHW: Sputw3181_2704

ILO: IL0872

CPS: CPS_1605 CPS_2626

PHA: PSHAa0908 PSHAa1454(atoB) PSHAa1586(atoB)

PAT: Patl_2923

SDE: Sde_3149

PIN: Ping_0659 Ping_2401

MAQ: Maqu_2117 Maqu_2489 Maqu_2696 Maqu_3162

CBU: CBU_0974

LPN: lpg1825(atoB)

LPF: lpl1789

LPP: lpp1788

NOC: Noc_1891

AEH: Mlg_0688 Mlg_2706

HHA: Hhal_1685

HCH: HCH_05299

CSA: Csal_0301 Csal_3068

ABO: ABO_0648(fadAx)

MMW: Mmwyl1_0073 Mmwyl1_3021 Mmwyl1_3053 Mmwyl1_3097 Mmwyl1_4182

AHA: AHA_2143(atoB)

CVI: CV_2088(atoB) CV_2790(phaA)

RSO: RSc0276(atoB) RSc1632(phbA) RSc1637(bktB) RSc1761(RS02948)

REU: Reut_A0138 Reut_A1348 Reut_A1353 Reut_B4561 Reut_B4738 Reut_B5587 Reut_C5943 Reut_C6062

REH: H16_A0170 H16_A0867 H16_A0868 H16_A0872 H16_A1297 H16_A1438(phaA) H16_A1445(bktB) H16_A1528 H16_A1713 H16_A1720 H16_A1887 H16_A2148 H16_B0380 H16_B0381 H16_B0406 H16_B0662 H16_B0668 H16_B0759 H16_B1369 H16_B1771

RME: Rmet_0106 Rmet_1357 Rmet_1362 Rmet_5156

BMA: BMA1316 BMA1321(phbA) BMA1436

BMV: BMASAVP1_A1805(bktB) BMASAVP1_A1810(phbA)

BML: BMA10299_A0086(phbA) BMA10299_A0091

BMN: BMA10247_1076(bktB) BMA10247_1081(phbA)

BXE: Bxe_A2273 Bxe_A2335 Bxe_A2342 Bxe_A4255 Bxe_B0377 Bxe_B0739 Bxe_C0332 Bxe_C0574 Bxe_C0915

BVI: Bcep1808_0519 Bcep1808_1717 Bcep1808_2877 Bcep1808_3594 Bcep1808_4015 Bcep1808_5507 Bcep1808_5644

BUR: Bcep18194_A3629 Bcep18194_A5080 Bcep18194_A5091 Bcep18194_A6102 Bcep18194_B0263 Bcep18194_B1439 Bcep18194_C6652 Bcep18194_C6802 Bcep18194_C6874 Bcep18194_C7118 Bcep18194_C7151 Bcep18194_C7332

BCN: Bcen_1553 Bcen_1599 Bcen_2158 Bcen_2563 Bcen_2998 Bcen_6289

BCH: Bcen2424_0542 Bcen2424_1790 Bcen2424_2772 Bcen2424_5368 Bcen2424_6232 Bcen2424_6276

BAM: Bamb_0447 Bamb_1728 Bamb_2824 Bamb_4717 Bamb_5771 Bamb_5969

BPS: BPSL1426 BPSL1535(phbA) BPSL1540

BPM: BURPS1710b_2325(bktB) BURPS1710b_2330(phbA) BURPS1710b_2453(atoB-2)

BPL: BURPS1106A_2197(bktB) BURPS1106A_2202(phbA)

BPD: BURPS668_2160(bktB) BURPS668_2165(phbA)

BTE: BTH_I2144 BTH_I2256 BTH_I2261

PNU: Pnuc_0927

BPE: BP0447 BP0668 BP2059

BPA: BPP0608 BPP1744 BPP3805 BPP4216 BPP4361

BBR: BB0614 BB3364 BB4250 BB4804 BB4947

RFR: Rfer_0272 Rfer_1000 Rfer_1871 Rfer_2273 Rfer_2561 Rfer_2594 Rfer_3839

POL: Bpro_1577 Bpro_2140 Bpro_3113 Bpro_4187

PNA: Pnap_0060 Pnap_0458 Pnap_0867 Pnap_1159 Pnap_2136 Pnap_2804

AAV: Aave_0031 Aave_2478 Aave_3944 Aave_4368

AJS: Ajs_0014 Ajs_0124 Ajs_1931 Ajs_2073 Ajs_2317 Ajs_3548 Ajs_3738 Ajs_3776

VEI: Veis_1331 Veis_3818 Veis_4193

DAC: Daci_0025 Daci_0192 Daci_3601 Daci_5988

MPT: Mpe_A1536 Mpe_A1776 Mpe_A1869 Mpe_A3367

HAR: HEAR0577(phbA)

MMS: mma_0555

NEU: NE2262(bktB)

NET: Neut_0610

EBA: ebA5202 p2A409(tioL)

AZO: azo0464(fadA1) azo0469(fadA2) azo2172(thlA)

DAR: Daro_0098 Daro_3022

HPA: HPAG1_0675

HAC: Hac_0958(atoB)

GME: Gmet_1719 Gmet_2074 Gmet_2213 Gmet_2268 Gmet_3302

GUR: Gura_3043

BBA: Bd0404(atoB) Bd2095

DOL: Dole_0671 Dole_1778 Dole_2160 Dole_2187

ADE: Adeh_0062 Adeh_2365

AFW: Anae109_0064 Anae109_1504

MXA: MXAN_3791

SAT: SYN_02642

SFU: Sfum_2280 Sfum_3582

RPR: RP737

RCO: RC1134 RC1135

RFE: RF_0163(paaJ)

RBE: RBE_0139(paaJ)

RAK: A1C_05820

RBO: A1I_07215

RCM: A1E_04760

PUB: SAR11_0428(thlA)

MLO: mlr3847

MES: Meso_3374

PLA: Plav_1573 Plav_2783

SME: SMa1450 SMc03879(phbA)

SMD: Smed_0499 Smed_3117 Smed_5094 Smed_5096

ATU: Atu2769(atoB) Atu3475

ATC: AGR_C_5022(phbA) AGR_L_2713

RET: RHE_CH04018(phbAch) RHE_PC00068(ypc00040)
RHE_PF00014(phbAf)
RLE: RL4621(phaA) pRL100301 pRL120369
BME: BMEI0274 BMEII0817
BMF: BAB1_1783(phbA-1) BAB2_0790(phbA-2)
BMS: BR1772(phbA-1) BRA0448(phbA-2)
BMB: BruAb1_1756(phbA-1) BruAb2_0774(phbA-2)
BOV: BOV_1707(phbA-1)
OAN: Oant_1130 Oant_3107 Oant_3718 Oant_4020
BJA: bll0226(atoB) bll3949 bll7400 bll7819 blr3724(phbA)
BRA: BRADO0562(phbA) BRADO0983(pimB) BRADO3110 BRA-DO3134(atoB)
BBT: BBta_3558 BBta_3575(atoB) BBta_5147(pimB) BBta_7072(pimB) BBta_7614(phbA)
RPA: RPA0513(pcaF) RPA0531 RPA3715(pimB)
RPB: RPB_0509 RPB_0525 RPB_1748
RPC: RPC_0504 RPC_0636 RPC_0641 RPC_0832 RPC_1050 RPC_2005 RPC_2194 RPC_2228
RPD: RPD_0306 RPD_0320 RPD_3105 RPD_3306
RPE: RPE_0168 RPE_0248 RPE_3827
NWI: Nwi_3060
XAU: Xaut_3108 Xaut_4665
CCR: CC_0510 CC_0894 CC_3462
SIL: SPO0142(bktB) SPO0326(phbA) SPO0773 SPO3408
SIT: TM1040_0067 TM1040_2790 TM1040_3026 TM1040_3735
RSP: RSP_0745 RSP_1354 RSP_3184
RSH: Rsph17029_0022 Rsph17029_2401 Rsph17029_3179 Rs-ph17029_3921
RSQ: Rsph17025_0012 Rsph17025_2466 Rsph17025_2833
JAN: Jann_0262 Jann_0493 Jann_4050
RDE: RD1_0025 RD1_0201(bktB) RD1_3394(phbA)
PDE: Pden_2026 Pden_2663 Pden_2870 Pden_2907 Pden_4811

Pden_5022

DSH: Dshi_0074 Dshi_3066 Dshi_3331

MMR: Mmar10_0697

HNE: HNE_2706 HNE_3065 HNE_3133

NAR: Saro_0809 Saro_1069 Saro_1222 Saro_2306 Saro_2349

SAL: Sala_0781 Sala_1244 Sala_2896 Sala_3158

SWI: Swit_0632 Swit_0752 Swit_2893 Swit_3602 Swit_4887 Swit_5019 Swit_5309

ELI: ELI_01475 ELI_06705 ELI_12035

GBE: GbCGDNIH1_0447

ACR: Acry_1847 Acry_2256

RRU: Rru_A0274 Rru_A1380 Rru_A1469 Rru_A1946 Rru_A3387

MAG: amb0842

MGM: Mmc1_1165

ABA: Acid345_3239

BSU: BG11319(mmgA) BG13063(yhfS)

BHA: BH1997 BH2029 BH3801(mmgA)

BAN: BA3687 BA4240 BA5589

BAR: GBAA3687 GBAA4240 GBAA5589

BAA: BA_0445 BA_4172 BA_4700

BAT: BAS3418 BAS3932 BAS5193

BCE: BC3627 BC4023 BC5344

BCA: BCE_3646 BCE_4076 BCE_5475

BCZ: BCZK3329(mmgA) BCZK3780(thl) BCZK5044(atoB)

BCY: Bcer98_2722 Bcer98_3865

BTK: BT9727_3379(mmgA) BT9727_3765(thl) BT9727_5028(atoB)

BTL: BALH_3262(mmgA) BALH_3642(fadA) BALH_4843(atoB)

BLI: BL03925(mmgA)

BLD: BLi03968(mmgA)

BCL: ABC0345 ABC2989 ABC3617 ABC3891(mmgA)

BAY: RBAM_022450

BPU: BPUM_2374(yhfS) BPUM_2941 BPUM_3373

OIH: OB0676 OB0689 OB2632 OB3013

GKA: GK1658 GK3397

SAU: SA0342 SA0534(vraB)

SAV: SAV0354 SAV0576(vraB)

SAM: MW0330 MW0531(vraB)

SAR: SAR0351(thl) SAR0581

SAS: SAS0330 SAS0534

SAC: SACOL0426 SACOL0622(atoB)

SAB: SAB0304(th1) SAB0526

SAA: SAUSA300_0355 SAUSA300_0560(vraB)

SAO: SAOUHSC_00336 SAOUHSC_00558

SAJ: SaurJH9_0402

SAH: SaurJH1_0412

SEP: SE0346 SE2384

SER: SERP0032 SERP0220

SHA: SH0510(mvaC) SH2417

SSP: SSP0325 SSP2145

LMO: lmo1414

LMF: LMOf2365_1433

LIN: lin1453

LWE: lwe1431

LLA: L11745(thiL) L25946(fadA)

LLC: LACR_1665 LACR_1956

LLM: llmg_0930(thiL)

SPY: SPy_0140 SPy_1637(atoB)

SPZ: M5005_Spy_0119 M5005_Spy_0432 M5005_Spy_1344(atoB)

SPM: spyM18_0136 spyM18_1645(atoB)

SPG: SpyM3_0108 SpyM3_1378(atoB)

SPS: SPs0110 SPs0484

SPH: MGAS10270_Spy0121 MGAS10270_Spy0433 MGAS10270_Spy1461(atoB)

SPI: MGAS10750_Spy0124 MGAS10750_Spy0452

MGAS10750_Spy1453(atoB)
SPJ: MGAS2096_Spy0123 MGAS2096_Spy0451
MGAS2096_Spy1365(atoB)
SPK: MGAS9429_Spy0121 MGAS9429_Spy0431
MGAS9429_Spy1339(atoB)
SPF: SpyM50447(atoB2)
SPA: M6_Spy0166 M6_Spy0466 M6_Spy1390
SPB: M28_Spy0117 M28_Spy0420 M28_Spy1385(atoB)
SAK: SAK_0568
LJO: LJ1609
LAC: LBA0626(thiL)
LSA: LSA1486
LDB: Ldb0879
LBU: LBUL_0804
LBR: LVIS_2218
LCA: LSEI_1787
LGA: LGAS_1374
LRE: Lreu_0052
EFA: EF1364
OOE: OEOE_0529
STH: STH2913 STH725 STH804
CAC: CAC2873 CA_P0078(thiL)
CPE: CPE2195(atoB)
CPF: CPF_2460
CPR: CPR_2170
CTC: CTC00312
CNO: NT01CX_0538 NT01CX_0603
CDF: CD1059(thlA1) CD2676(thlA2)
CBO: CBO3200(thl)
CBE: Cbei_0411 Cbei_3630
CKL: CKL_3696(thlA1) CKL_3697(thlA2) CKL_3698(thlA3)
AMT: Amet_4630

AOE: Clos_0084 Clos_0258

CHY: CHY_1288 CHY_1355(atoB) CHY_1604 CHY_1738

DSY: DSY0632 DSY0639 DSY1567 DSY1710 DSY2402 DSY3302

DRM: Dred_0400 Dred_1491 Dred_1784 Dred_1892

SWO: Swol_0308 Swol_0675 Swol_0789 Swol_1486 Swol_1934 Swol_2051

TTE: TTE0549(paaJ)

MTA: Moth_1260

MTU: Rv1135A Rv1323(fadA4) Rv3546(fadA5)

MTC: MT1365(phbA)

MBO: Mb1167 Mb1358(fadA4) Mb3576(fadA5) Mb3586c(fadA6)

MBB: BCG_1197 BCG_1385(fadA4) BCG_3610(fadA5) BCG_3620c(fadA6)

MLE: ML1158(fadA4)

MPA: MAP2407c(fadA3) MAP2436c(fadA4)

MAV: MAV_1544 MAV_1573 MAV_1863 MAV_5081

MSM: MSMEG_2224 MSMEG_4920

MUL: MUL_0357

MVA: Mvan_1976 Mvan_1988 Mvan_4305 Mvan_4677 Mvan_4891

MGI: Mflv_1347 Mflv_1484 Mflv_2040 Mflv_2340 Mflv_4356 Mflv_4368

MMC: Mmcs_1758 Mmcs_1769 Mmcs_3796 Mmcs_3864

MKM: Mkms_0251 Mkms_1540 Mkms_1805 Mkms_1816 Mkms_2836 Mkms_3159 Mkms_3286 Mkms_3869 Mkms_3938 Mkms_4227 Mkms_4411 Mkms_4580 Mkms_4724 Mkms_4764 Mkms_4776

MJL: Mjls_0231 Mjls_1739 Mjls_1750 Mjls_2819 Mjls_3119 Mjls_3235 Mjls_3800 Mjls_3850 Mjls_4110 Mjls_4383 Mjls_4705 Mjls_4876 Mjls_5018 Mjls_5063 Mjls_5075

CGL: NCgl2309(cgl2392)

CGB: cg2625(pcaF)

CEF: CE0731 CE2295

CJK: jk1543(fadA3)

NFA: nfa10750(fadA4)
RHA: RHA1_ro01455 RHA1_ro01623 RHA1_ro01876
RHA1_ro02517(catF)
RHA1_ro03022 RHA1_ro03024 RHA1_ro03391 RHA1_ro03892
RHA1_ro04599 RHA1_ro05257 RHA1_ro08871
SCO: SCO5399(SC8F4.03)
SMA: SAV1384(fadA5) SAV2856(fadA1)
ART: Arth_1160 Arth_2986 Arth_3268 Arth_4073
NCA: Noca_1371 Noca_1797 Noca_1828 Noca_2764 Noca_4142
TFU: Tfu_1520 Tfu_2394
FRA: Francci3_3687
FRE: Franean1_1044 Franean1_2711 Franean1_2726 Franean1_3929
Franean1_4037 Franean1_4577
FAL: FRAAL2514 FRAAL2618 FRAAL5910(atoB)
ACE: Acel_0626 Acel_0672
SEN: SACE_1192(mmgA) SACE_2736(fadA6) SACE_4011(catF)
SACE_6236(fadA4)
STP: Strop_3610
SAQ: Sare_1316 Sare_3991
RXY: Rxyl_1582 Rxyl_1842 Rxyl_2389 Rxyl_2530
FNU: FN0495
BGA: BG0110(fadA)
BAF: BAPKO_0110(fadA)
LIL: LA0457(thiL1) LA0828(thiL2) LA4139(fadA)
LIC: LIC10396(phbA)
LBJ: LBJ_2862(paaJ-4)
LBL: LBL_0209(paaJ-4)
SYN: slr1993(phaA)
SRU: SRU_1211(atoB) SRU_1547
CHU: CHU_1910(atoB)
GFO: GFO_1507(atoB)
FJO: Fjoh_4612

FPS: FP0770 FP1586 FP1725

RRS: RoseRS_3911 RoseRS_4348

RCA: Rcas_0702 Rcas_3206

HAU: Haur_0522

DRA: DR_1072 DR_1428 DR_1960 DR_2480 DR_A0053

DGE: Dgeo_0755 Dgeo_1305 Dgeo_1441 Dgeo_1883

TTH: TTC0191 TTC0330

TTJ: TTHA0559

TME: Tmel_1134

FNO: Fnod_0314

PMO: Pmob_0515

HMA: rrnAC0896(acaB3) rrnAC2815(aca2) rrnAC3497(yqeF)
rrnB0240(aca1) rrnB0242(acaB2) rrnB0309(acaB1)

TAC: Ta0582

TVO: TVN0649

PTO: PTO1505

APE: APE_2108

SSO: SSO2377(acaB-4)

STO: ST0514

SAI: Saci_0963 Saci_1361(acaB1)

MSE: Msed_0656

PAI: PAE1220

PIS: Pisl_0029 Pisl_1301

PCL: Pcal_0781

PAS: Pars_0309 Pars_1071

CMA: Cmaq_1941

Ácidos nucleicos e polipeptídeos exemplares de HMG-CoA sintase

HSA: 3157(HMGCS1) 3158(HMGCS2)

PTR: 457169(HMGCS2) 461892(HMGCS1)

MCC: 702553(HMGCS1) 713541(HMGCS2)

MMU: 15360(Hmgcs2) 208715(Hmgcs1)

RNO: 24450(Hmgcs2) 29637(Hmgcs1)

CFA: 479344(HMGCS1) 607923(HMGCS2)
BTA: 407767(HMGCS1)
SSC: 397673(CH242-38B5.1)
GGA: 396379(HMGCS1)
XLA: 380091(hmgcs1) 447204(MGC80816)
DRE: 394060(hmgcs1)
SPU: 578259(LOC578259)
DME: Dmel_CG4311(Hmgs)
CEL: F25B4.6
ATH: AT4G11820(BAP1)
OSA: 4331418 4347614
CME: CMM189C
SCE: YML126C(ERG13)
AGO: AGOS_ADL356C
PIC: PICST_83020
CAL: CaO19_7312(CaO19.7312)
CGR: CAGL0H04081g
SPO: SPAC4F8.14c(hcs)
MGR: MGG_01026
ANI: AN4923.2
AFM: AFUA_3G10660 AFUA_8G07210
AOR: AO090003000611 AO090010000487
CNE: CNC05080 CNG02670
UMA: UM05362.1
ECU: ECU10_0510
DDI: DDBDRAFT_0217522 DDB_0219924(hgsA)
TET: TTHERM_00691190
TBR: Tb927.8.6110
YPE: YPO1457
YPK: y2712(pksG)
YPM: YP_1349(pksG)
YPA: YPA_0750

YPN: YPN_2521

YPP: YPDSF_1517

YPS: YPTB1475

CBD: COXBU7E912_1931

TCX: Tcr_1719

DNO: DNO_0799

BMA: BMAA1212

BPS: BPSS1002

BPM: BURPS1710b_A2613

BPL: BURPS1106A_A1384

BPD: BURPS668_A1470

BTE: BTH_II1670

MXA: MXAN_3948(tac) MXAN_4267(mvaS)

BSU: BG10926(pksG)

OIH: OB2248

SAU: SA2334(mvaS)

SAV: SAV2546(mvaS)

SAM: MW2467(mvaS)

SAR: SAR2626(mvaS)

SAS: SAS2432

SAC: SACOL2561

SAB: SAB2420(mvaS)

SAA: SAUSA300_2484

SAO: SAOUHSC_02860

SAJ: SaurJH9_2569

SAH: SaurJH1_2622

SEP: SE2110

SER: SERP2122

SHA: SH0508(mvaS)

SSP: SSP0324

LMO: lmo1415

LMF: LMOf2365_1434(mvaS)

LIN: lin1454
LWE: lwe1432(mvaS)
LLA: L13187(hmcM)
LLC: LACR_1666
LLM: llmg_0929(hmcM)
SPY: SPy_0881(mvaS.2)
SPZ: M5005_Spy_0687(mvaS.1)
SPM: spyM18_0942(mvaS2)
SPG: SpyM3_0600(mvaS.2)
SPS: SPs1253
SPH: MGAS10270_Spy0745(mvaS1)
SPI: MGAS10750_Spy0779(mvaS1)
SPJ: MGAS2096_Spy0759(mvaS1)
SPK: MGAS9429_Spy0743(mvaS1)
SPF: SpyM51121(mvaS)
SPA: M6_Spy0704
SPB: M28_Spy0667(mvaS.1)
SPN: SP_1727
SPR: spr1571(mvaS)
SPD: SPD_1537(mvaS)
SAG: SAG1316
SAN: gbs1386
SAK: SAK_1347
SMU: SMU.943c
STC: str0577(mvaS)
STL: stu0577(mvaS)
STE: STER_0621
SSA: SSA_0338(mvaS)
SSU: SSU05_1641
SSV: SSU98_1652
SGO: SGO_0244
LPL: lp_2067(mvaS)

LJO: LJ1607

LAC: LBA0628(hmcS)

LSA: LSA1484(mvaS)

LSL: LSL_0526

LDB: Ldb0881(mvaS)

LBU: LBUL_0806

LBR: LVIS_1363

LCA: LSEI_1785

LGA: LGAS_1372

LRE: Lreu_0676

PPE: PEPE_0868

EFA: EF1363

OOE: OEOE_0968

LME: LEUM_1184

NFA: nfa22120

SEN: SACE_4570(pksG)

BBU: BB0683

BGA: BG0706

BAF: BAPKO_0727

FJO: Fjoh_0678

HAL: VNG1615G(mvaB)

HMA: rrnAC1740(mvaS)

HWA: HQ2868A(mvaB)

NPH: NP2608A(mvaB_1) NP4836A(mvaB_2)

Ácidos nucleicos e polipeptídeos exemplares de hidroximetilglutaril-CoA redutase

HSA: 3156(HMGCR)

PTR: 471516(HMGCR)

MCC: 705479(HMGCR)

MMU: 15357(Hmgcr)

RNO: 25675(Hmgcr)

CFA: 479182(HMGCR)

BTA: 407159(HMGCR)
GGA: 395145(RCJMB04_14m24)
SPU: 373355(LOC373355)
DME: Dmel_CG10367(Hmgcr)
CEL: F08F8.2
OSA: 4347443
SCE: YLR450W(HMG2) YML075C(HMG1)
AGO: AGOS_AER152W
CGR: CAGL0L11506g
SPO: SPCC162.09c(hmg1)
ANI: AN3817.2
AFM: AFUA_1G11230 AFUA_2G03700
AOR: AO090103000311 AO090120000217
CNE: CNF04830
UMA: UM03014.1
ECU: ECU10_1720
DDI: DDB_0191125(hmgA) DDB_0215357(hmgB)
TBR: Tb927.6.4540
TCR: 506831.40 509167.20
LMA: LmjF30.3190
VCH: VCA0723
VCO: VC0395_0662
VVU: VV2_0117
VVY: VVA0625
VPA: VPA0968
VFI: VFA0841
PAT: Patl_0427
CBU: CBU_0030 CBU_0610
CBD: COXBU7E912_0151 COXBU7E912_0622(hmgA)
TCX: Tcr_1717
DNO: DNO_0797
CVI: CV_1806

SUS: Acid_5728 Acid_6132
SAU: SA2333(mvaA)
SAV: SAV2545(mvaA)
SAM: MW2466(mvaA)
SAB: SAB2419c(mvaA)
SEP: SE2109
LWE: lwe0819(mvaA)
LLA: L10433(mvaA)
LLC: LACR_1664
LLM: llmg_0931(mvaA)
SPY: SPy_0880(mvaS.1)
SPM: spyM18_0941(mvaS1)
SPG: SpyM3_0599(mvaS.1)
SPS: SPs1254
SPH: MGAS10270_Spy0744
SPI: MGAS10750_Spy0778
SPJ: MGAS2096_Spy0758
SPK: MGAS9429_Spy0742
SPA: M6_Spy0703
SPN: SP_1726
SAG: SAG1317
SAN: gbs1387
STC: str0576(mvaA)
STL: stu0576(mvaA)
STE: STER_0620
SSA: SSA_0337(mvaA)
LPL: lp_0447(mvaA)
LJO: LJ1608
LSL: LSL_0224
LBR: LVIS_0450
LGA: LGAS_1373
EFA: EF1364

NFA: nfa22110
BGA: BG0708(mvaA)
SRU: SRU_2422
FPS: FP2341
MMP: MMP0087(hmgA)
MMQ: MmarC5_1589
MAC: MA3073(hmgA)
MBA: Mbar_A1972
MMA: MM_0335
MBU: Mbur_1098
MHU: Mhun_3004
MEM: Memar_2365
MBN: Mboo_0137
MTH: MTH562
MST: Msp_0584(hmgA)
MSI: Msm_0227
MKA: MK0355(HMG1)
AFU: AF1736(mvaA)
HAL: VNG1875G(mvaA)
HMA: rrnAC3412(mvaA)
HWA: HQ3215A(hmgR)
NPH: NP0368A(mvaA_2) NP2422A(mvaA_1)
TAC: Ta0406m
TVO: TVN1168
PTO: PTO1143
PAB: PAB2106(mvaA)
PFU: PF1848
TKO: TK0914
RCI: RCIX1027(hmgA) RCIX376(hmgA)
APE: APE_1869
IHO: Igni_0476
HBU: Hbut_1531

SSO: SSO0531

STO: ST1352

SAI: Saci_1359

PAI: PAE2182

PIS: Pisl_0814

PCL: Pcal_1085

PAS: Pars_0796

Ácidos nucleicos e polipeptídeos exemplares de mevalonato quinase

HSA: 4598(MVK)

MCC: 707645(MVK)

MMU: 17855(Mvk)

RNO: 81727(Mvk)

CFA: 486309(MVK)

BTA: 505792(MVK)

GGA: 768555(MVK)

DRE: 492477(zgc:103473)

SPU: 585785(LOC585785)

DME: Dmel_CG33671

OSA: 4348331

SCE: YMR208W(ERG12)

AGO: AGOS_AER335W

PIC: PICST_40742(ERG12)

CGR: CAGL0F03861g

SPO: SPAC13G6.11c

MGR: MGG_06946

ANI: AN3869.2

AFM: AFUA_4G07780

AOR: AO090023000793

CNE: CNK01740

ECU: ECU09_1780

DDI: DDBDRAFT_0168621

TET: TTHERM_00637680

TBR: Tb927.4.4070

TCR: 436521.9 509237.10

LMA: LmjF31.0560

CBU: CBU_0608 CBU_0609

CBD: COXBU7E912_0620(mvk)

LPN: lpg2039

LPF: lpl2017

LPP: lpp2022

BBA: Bd1027(lmbP) Bd1630(mvk)

MXA: MXAN_5019(mvk)

OIH: OB0225

SAU: SA0547(mvaK1)

SAV: SAV0590(mvaK1)

SAM: MW0545(mvaK1)

SAR: SAR0596(mvaK1)

SAS: SAS0549

SAC: SACOL0636(mvk)

SAB: SAB0540(mvaK1)

SAA: SAUSA300_0572(mvk)

SAO: SAOUHSC_00577

SEP: SE0361

SER: SERP0238(mvk)

SHA: SH2402(mvaK1)

SSP: SSP2122

LMO: lmo0010

LMF: LMOf2365_0011

LIN: lin0010

LWE: lwe0011(mvk)

LLA: L7866(yeaG)

LLC: LACR_0454

LLM: llmg_0425(mvk)

SPY: SPy_0876(mvaK1)

SPZ: M5005_Spy_0682(mvaK1)
SPM: spyM18_0937(mvaK1)
SPG: SpyM3_0595(mvaK1)
SPS: SPs1258
SPH: MGAS10270_Spy0740(mvaK1)
SPI: MGAS10750_Spy0774(mvaK1)
SPJ: MGAS2096_Spy0753(mvaK1)
SPK: MGAS9429_Spy0737(mvaK1)
SPF: SpyM51126(mvaK1)
SPA: M6_Spy0699
SPB: M28_Spy0662(mvaK1)
SPN: SP_0381
SPR: spr0338(mvk)
SPD: SPD_0346(mvk)
SAG: SAG1326
SAN: gbs1396
SAK: SAK_1357(mvk)
SMU: SMU.181
STC: str0559(mvaK1)
STL: stu0559(mvaK1)
STE: STER_0598
SSA: SSA_0333(mvaK1)
SSU: SSU05_0289
SSV: SSU98_0285
SGO: SGO_0239(mvk)
LPL: lp_1735(mvaK1)
LJO: LJ1205
LAC: LBA1167(mvaK)
LSA: LSA0908(mvaK1)
LSL: LSL_0685(eRG)
LDB: Ldb0999(mvk)
LBU: LBUL_0906

LBR: LVIS_0858

LCA: LSEI_1491

LGA: LGAS_1033

LRE: Lreu_0915

PPE: PEPE_0927

EFA: EF0904(mvk)

OOE: OEOE_1100

LME: LEUM_1385

NFA: nfa22070

BGA: BG0711

BAF: BAPKO_0732

FPS: FP0313

MMP: MMP1335

MAE: Maeo_0775

MAC: MA0602(mvk)

MBA: Mbar_A1421

MMA: MM_1762

MBU: Mbur_2395

MHU: Mhun_2890

MEM: Memar_1812

MBN: Mboo_2213

MST: Msp_0858(mvk)

MSI: Msm_1439

MKA: MK0993(ERG12)

HAL: VNG1145G(mvk)

HMA: rrnAC0077(mvk)

HWA: HQ2925A(mvk)

NPH: NP2850A(mvk)

PTO: PTO1352

PHO: PH1625

PAB: PAB0372(mvk)

PFU: PF1637(mvk)

TKO: TK1474

RCI: LRC399(mvk)

APE: APE_2439

HBU: Hbut_0877

SSO: SSO0383

STO: ST2185

SAI: Saci_2365(mvk)

MSE: Msed_1602

PAI: PAE3108

PIS: Pisl_0467

PCL: Pcal_1835

Ácidos nucleicos e polipeptídeos exemplares de fosfomevalonato quinase

HSA: 10654(PMVK)

PTR: 457350(PMVK)

MCC: 717014(PMVK)

MMU: 68603(Pmvk)

CFA: 612251(PMVK)

BTA: 513533(PMVK)

DME: Dmel_CG10268

ATH: AT1G31910

OSA: 4332275

SCE: YMR220W(ERG8)

AGO: AGOS_AER354W

PIC: PICST_52257(ERG8)

CGR: CAGL0F03993g

SPO: SPAC343.01c

MGR: MGG_05812

ANI: AN2311.2

AFM: AFUA_5G10680

AOR: AO090010000471

CNE: CNM00100

UMA: UM00760.1

DDI: DDBDRAFT_0184512

TBR: Tb09.160.3690

TCR: 507913.20 508277.140

LMA: LmjF15.1460

MXA: MXAN_5017

OIH: OB0227

SAU: SA0549(mvaK2)

SAV: SAV0592(mvaK2)

SAM: MW0547(mvaK2)

SAR: SAR0598(mvaK2)

SAS: SAS0551

SAC: SACOL0638

SAB: SAB0542(mvaK2)

SAA: SAUSA300_0574

SAO: SAOUHSC_00579

SAJ: SaurJH9_0615

SEP: SE0363

SER: SERP0240

SHA: SH2400(mvaK2)

SSP: SSP2120

LMO: lmo0012

LMF: LMOf2365_0013

LIN: lin0012

LWE: lwe0013

LLA: L10014(yebA)

LLC: LACR_0456

LLM: llmg_0427

SPY: SPy_0878(mvaK2)

SPZ: M5005_Spy_0684(mvaK2)

SPM: spyM18_0939

SPG: SpyM3_0597(mvaK2)

SPS: SPs1256

SPH: MGAS10270_Spy0742(mvaK2)
SPI: MGAS10750_Spy0776(mvaK2)
SPJ: MGAS2096_Spy0755(mvaK2)
SPK: MGAS9429_Spy0739(mvaK2)
SPF: SpyM51124(mvaK2)
SPA: M6_Spy0701
SPB: M28_Spy0664(mvaK2)
SPN: SP_0383
SPR: spr0340(mvaK2)
SPD: SPD_0348(mvaK2)
SAG: SAG1324
SAN: gbs1394
SAK: SAK_1355
SMU: SMU.938
STC: str0561(mvaK2)
STL: stu0561(mvaK2)
STE: STER_0600
SSA: SSA_0335(mvaK2)
SSU: SSU05_0291
SSV: SSU98_0287
SGO: SGO_0241
LPL: lp_1733(mvaK2)
LJO: LJ1207
LAC: LBA1169
LSA: LSA0906(mvaK2)
LSL: LSL_0683
LDB: Ldb0997(mvaK)
LBU: LBUL_0904
LBR: LVIS_0860
LCA: LSEI_1092
LGA: LGAS_1035
LRE: Lreu_0913

PPE: PEPE_0925

EFA: EF0902

NFA: nfa22090

BGA: BG0710

BAF: BAPKO_0731

NPH: NP2852A

SSO: SSO2988

STO: ST0978

SAI: Saci_1244

Ácidos nucleicos e polipeptídeos exemplares de difosfomevalonato descarboxilase

HSA: 4597(MVD)

PTR: 468069(MVD)

MCC: 696865(MVD)

MMU: 192156(Mvd)

RNO: 81726(Mvd)

CFA: 489663(MVD)

GGA: 425359(MVD)

DME: Dmel_CG8239

SCE: YNR043W(MVD1)

AGO: AGOS_AGL232C

PIC: PICST_90752

CGR: CAGL0C03630g

SPO: SPAC24C9.03

MGR: MGG_09750

ANI: AN4414.2

AFM: AFUA_4G07130

AOR: AO090023000862

CNE: CNL04950

UMA: UM05179.1

DDI: DDBDRAFT_0218058

TET: TTHERM_00849200

TBR: Tb10.05.0010 Tb10.61.2745
TCR: 507993.330 511281.40
LMA: LmjF18.0020
CBU: CBU_0607(mvaD)
CBD: COXBU7E912_0619(mvaD)
LPN: lpg2040
LPF: lpl2018
LPP: lpp2023
TCX: Tcr_1734
DNO: DNO_0504(mvaD)
BBA: Bd1629
MXA: MXAN_5018(mvaD)
OIH: OB0226
SAU: SA0548(mvaD)
SAV: SAV0591(mvaD)
SAM: MW0546(mvaD)
SAR: SAR0597(mvaD)
SAS: SAS0550
SAC: SACOL0637(mvaD)
SAB: SAB0541(mvaD)
SAA: SAUSA300_0573(mvaD)
SAO: SAOUHSC_00578
SAJ: SaurJH9_0614
SAH: SaurJH1_0629
SEP: SE0362
SER: SERP0239(mvaD)
SHA: SH2401(mvaD)
SSP: SSP2121
LMO: lmo0011
LMF: LMOf2365_0012(mvaD)
LIN: lin0011
LWE: lwe0012(mvaD)

LLA: L9089(yeaH)
LLC: LACR_0455
LLM: llmg_0426(mvaD)
SPY: SPy_0877(mvaD)
SPZ: M5005_Spy_0683(mvaD)
SPM: spyM18_0938(mvd)
SPG: SpyM3_0596(mvaD)
SPS: SPs1257
SPH: MGAS10270_Spy0741(mvaD)
SPI: MGAS10750_Spy0775(mvaD)
SPJ: MGAS2096_Spy0754(mvaD)
SPK: MGAS9429_Spy0738(mvaD)
SPF: SpyM51125(mvaD)
SPA: M6_Spy0700
SPB: M28_Spy0663(mvaD)
SPN: SP_0382
SPR: spr0339(mvd1)
SPD: SPD_0347(mvaD)
SAG: SAG1325(mvaD)
SAN: gbs1395
SAK: SAK_1356(mvaD)
SMU: SMU.937
STC: str0560(mvaD)
STL: stu0560(mvaD)
STE: STER_0599
SSA: SSA_0334(mvaD)
SSU: SSU05_0290
SSV: SSU98_0286
SGO: SGO_0240(mvaD)
LPL: lp_1734(mvaD)
LJO: LJ1206
LAC: LBA1168(mvaD)

LSA: LSA0907(mvaD)

LSL: LSL_0684

LDB: Ldb0998(mvaD)

LBU: LBUL_0905

LBR: LVIS_0859

LCA: LSEI_1492

LGA: LGAS_1034

LRE: Lreu_0914

PPE: PEPE_0926

EFA: EF0903(mvaD)

LME: LEUM_1386

NFA: nfa22080

BBU: BB0686

BGA: BG0709

BAF: BAPKO_0730

GFO: GFO_3632

FPS: FP0310(mvaD)

HAU: Haur_1612

HAL: VNG0593G(dmd)

HMA: rrnAC1489(dmd)

HWA: HQ1525A(mvaD)

NPH: NP1580A(mvaD)

PTO: PTO0478 PTO1356

SSO: SSO2989

STO: ST0977

SAI: Saci_1245(mvd)

MSE: Msed_1576

Ácidos nucleicos e polipeptídeos exemplares de isopentenil fosfato quinases (IPK)

Methanobacterium thermoautotrophicum gi|2621082

Methanococcus jannaschii DSM 2661 gi|1590842 ;

Methanocaldococcus jannaschii gi|1590842

Methanothermobacter thermautotrophicus gi|2621082

Picrophilus torridus DSM9790 (IG-57) gi|48477569

Pyrococcus abyssi gi|14520758

Pyrococcus horikoshii OT3 gi|3258052

Archaeoglobus fulgidus DSM4304 gi|2648231

Ácidos nucleicos e polipeptídeos exemplares de isopentenil-difosfato Delta-isomerase (IDI)

HSA: 3422(IDI1) 91734(IDI2)

PTR: 450262(IDI2) 450263(IDI1)

MCC: 710052(LOC710052) 721730(LOC721730)

MMU: 319554(Idi1)

RNO: 89784(Idi1)

GGA: 420459(IDI1)

XLA: 494671(LOC494671)

XTR: 496783(idi2)

SPU: 586184(LOC586184)

CEL: K06H7.9(idi-1)

ATH: AT3G02780(IPP2)

OSA: 4338791 4343523

CME: CMB062C

SCE: YPL117C(IDI1)

AGO: AGOS_ADL268C

PIC: PICST_68990(IDI1)

CGR: CAGL0J06952g

SPO: SPBC106.15(idi1)

ANI: AN0579.2

AFM: AFUA_6G11160

AOR: AO090023000500

CNE: CNA02550

UMA: UM04838.1

ECU: ECU02_0230

DDI: DDB_0191342(ipi)

TET: TTHERM_00237280 TTHERM_00438860
TBR: Tb09.211.0700
TCR: 408799.19 510431.10
LMA: LmjF35.5330
EHI: 46.t00025
ECO: b2889(idi)
ECJ: JW2857(idi)
ECE: Z4227
ECS: ECs3761
ECC: c3467
ECI: UTI89_C3274
ECP: ECP_2882
ECV: APECO1_3638
ECW: EcE24377A_3215(idi)
ECX: EcHS_A3048
STY: STY3195
STT: t2957
SPT: SPA2907(idi)
SEC: SC2979(idi)
STM: STM3039(idi)
SFL: SF2875(idi)
SFX: S3074
SFV: SFV_2937
SSN: SSON_3042 SSON_3489(yhfK)
SBO: SBO_3103
SDY: SDY_3193
ECA: ECA2789
PLU: plu3987
ENT: Ent638_3307
SPE: Spro_2201
VPA: VPA0278
VFI: VF0403

PPR: PBPRA0469(mvaD)
PEN: PSEEN4850
CBU: CBU_0607(mvaD)
CBD: COXBU7E912_0619(mvaD)
LPN: lpg2051
LPF: lpl2029
LPP: lpp2034
TCX: Tcr_1718
HHA: Hhal_1623
DNO: DNO_0798
EBA: ebA5678 p2A143
DVU: DVU1679(idi)
DDE: Dde_1991
LIP: LI1134
BBA: Bd1626
AFW: Anae109_4082
MXA: MXAN_5021(fni)
RPR: RP452
RTY: RT0439(idi)
RCO: RC0744
RFE: RF_0785(fni)
RBE: RBE_0731(fni)
RAK: A1C_04190
RBO: A1I_04755
RCM: A1E_02555
RRI: A1G_04195
MLO: mlr6371
RET: RHE_PD00245(ypd00046)
XAU: Xaut_4134
SIL: SPO0131
SIT: TM1040_3442
RSP: RSP_0276

RSH: Rsph17029_1919
RSQ: Rsph17025_1019
JAN: Jann_0168
RDE: RD1_0147(idi)
DSH: Dshi_3527
BSU: BG11440(ypgA)
BAN: BA1520
BAR: GBAA1520
BAA: BA_2041
BAT: BAS1409
BCE: BC1499
BCA: BCE_1626
BCZ: BCZK1380(fni)
BCY: Bcer98_1222
BTK: BT9727_1381(fni)
BTL: BALH_1354
BLI: BL02217(fni)
BLD: BLi02426
BAY: RBAM_021020(fni)
BPU: BPUM_2020(fni)
OIH: OB0537
SAU: SA2136(fni)
SAV: SAV2346(fni)
SAM: MW2267(fni)
SAR: SAR2431(fni)
SAS: SAS2237
SAC: SACOL2341(fni)
SAB: SAB2225c(fni)
SAA: SAUSA300_2292(fni)
SAO: SAOUHSC_02623
SEP: SE1925
SER: SERP1937(fni-2)

SHA: SH0712(fni)

SSP: SSP0556

LMO: lmo1383

LMF: LMOf2365_1402(fni)

LIN: lin1420

LWE: lwe1399(fni)

LLA: L11083(yebB)

LLC: LACR_0457

LLM: llmg_0428(fni)

SPY: SPy_0879

SPZ: M5005_Spy_0685

SPM: spyM18_0940

SPG: SpyM3_0598

SPS: SPs1255

SPH: MGAS10270_Spy0743

SPI: MGAS10750_Spy0777

SPJ: MGAS2096_Spy0756

SPK: MGAS9429_Spy0740

SPF: SpyM51123(fni)

SPA: M6_Spy0702

SPB: M28_Spy0665

SPN: SP_0384

SPR: spr0341(fni)

SPD: SPD_0349(fni)

SAG: SAG1323

SAN: gbs1393

SAK: SAK_1354(fni)

SMU: SMU.939

STC: str0562(idi)

STL: stu0562(idi)

STE: STER_0601

SSA: SSA_0336

SGO: SGO_0242
LPL: lp_1732(idi1)
LJO: LJ1208
LAC: LBA1171
LSA: LSA0905(idi)
LSL: LSL_0682
LDB: Ldb0996(fni)
LBU: LBUL_0903
LBR: LVIS_0861
LCA: LSEI_1493
LGA: LGAS_1036
LRE: Lreu_0912
EFA: EF0901
OOE: OEOE_1103
STH: STH1674
CBE: Cbei_3081
DRM: Dred_0474
SWO: Swol_1341
MTA: Moth_1328
MTU: Rv1745c(idi)
MTC: MT1787(idi)
MBO: Mb1774c(idi)
MBB: BCG_1784c(idi)
MPA: MAP3079c
MAV: MAV_3894(fni)
MSM: MSMEG_1057(fni) MSMEG_2337(fni)
MUL: MUL_0380(idi2)
MVA: Mvan_1582 Mvan_2176
MGI: Mflv_1842 Mflv_4187
MMC: Mmcs_1954
MKM: Mkms_2000
MJL: Mjls_1934

CGL: NCgl2223(cgl2305)
CGB: cg2531(idi)
CEF: CE2207
CDI: DIP1730(idi)
NFA: nfa19790 nfa22100
RHA: RHA1_ro00239
SCO: SCO6750(SC5F2A.33c)
SMA: SAV1663(idi)
LXX: Lxx23810(idi)
CMI: CMM_2889(idiA)
AAU: AAur_0321(idi)
PAC: PPA2115
FRA: Francci3_4188
FRE: Franean1_5570
FAL: FRAAL6504(idi)
KRA: Krad_3991
SEN: SACE_2627(idiB_2) SACE_5210(idi)
STP: Strop_4438
SAQ: Sare_4564 Sare_4928
RXY: Rxyl_0400
BBU: BB0684
BGA: BG0707
SYN: sll1556
SYC: syc2161_c
SYF: Synpcc7942_1933
CYA: CYA_2395(fni)
CYB: CYB_2691(fni)
TEL: tll1403
ANA: all4591
AVA: Ava_2461 Ava_B0346
TER: Tery_1589
SRU: SRU_1900(idi)

CHU: CHU_0674(idi)
GFO: GFO_2363(idi)
FJO: Fjoh_0269
FPS: FP1792(idi)
CTE: CT0257
CCH: Cag_1445
CPH: Cpha266_0385
PVI: Cvib_1545
PLT: Plut_1764
RRS: RoseRS_2437
RCA: Rcas_2215
HAU: Haur_4687
DRA: DR_1087
DGE: Dgeo_1381
TTH: TT_P0067
TTJ: TTHB110
MJA: MJ0862
MMP: MMP0043
MMQ: MmarC5_1637
MMX: MmarC6_0906
MMZ: MmarC7_1040
MAE: Maeo_1184
MVN: Mevan_1058
MAC: MA0604(idi)
MBA: Mbar_A1419
MMA: MM_1764
MBU: Mbur_2397
MTP: Mthe_0474
MHU: Mhun_2888
MLA: Mlab_1665
MEM: Memar_1814
MBN: Mboo_2211

MTH: MTH48

MST: Msp_0856(fni)

MSI: Msm_1441

MKA: MK0776(lldD)

AFU: AF2287

HAL: VNG1818G(idi) VNG6081G(crt_1) VNG6445G(crt_2) VNG7060 VNG7149

HMA: rrnAC3484(idi)

HWA: HQ2772A(idiA) HQ2847A(idiB)

NPH: NP0360A(idiB_1) NP4826A(idiA) NP5124A(idiB_2)

TAC: Ta0102

TVO: TVN0179

PTO: PTO0496

PHO: PH1202

PAB: PAB1662

PFU: PF0856

TKO: TK1470

RCI: LRC397(fni)

APE: APE_1765.1

SMR: Smar_0822

IHO: Igni_0804

HBU: Hbut_0539

SSO: SSO0063

STO: ST2059

SAI: Saci_0091

MSE: Msed_2136

PAI: PAE0801

PIS: Pisl_1093

PCL: Pcal_0017

PAS: Pars_0051

TPE: Tpen_0272

Ácidos nucleicos e polipeptídeos exemplares de isopreno sintase

Nos. de Acesso do Genbank

AY341431

AY316691

AY279379

AJ457070

AY182241

REIVINDICAÇÕES

1. Método para produzir isopreno, o método compreendendo

(a) cultivar células compreendendo um ou mais ácidos nucleicos que codificam polipeptídeo de isopreno sintase sob condições adequadas para a produção de isopreno; e

(b) produzir isopreno, em que as células produzem mais que cerca de 400 nmol g_{wcm}/hora de isopreno e em que a taxa de evolução de dióxido de carbono das células é maior que cerca de 1 x 10^{-18} mmol/L/hora.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, que compreende adicionalmete recuperar o isopreno.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que as células compreendem ainda um ou mais. ácidos nucleicos heterólogos ou uma ou mais cópias adicionais de um ácido nucleico endógeno codificando um polipeptídeo de isopreno sintase.

4. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que as células compreendem ainda um ou mais. ácidos nucleicos heterólogos ou uma ou mais cópias adicionais de um ácido nucleico endógeno codificando um polipeptídeo IDI, uma enzima da via do MVA e uma enzima da via da DXP.

5. Método, de acordo com a reivindicação 4, em que a enzima da via do MVA é mevalonato quinase.

6. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que o polipeptídeo de isopreno sintase é um polipeptídio de *Pueraria* ou *Populus* ou de um híbrido, *Populus alba x Populus tremula.*

7. Método, de acordo com a reivindicação 6, em que o polipeptídeo de isopreno sintase é selecionado do grupo que consiste em *Pueraria montana ou Pueraria lobata, Populus tremuloides, Populus alba, Populus nigra*, e *Populus trichocarpa.*

8. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que as células são células bacterianas gram-positivas, células de *Streptomyces*, células bacterianas gram-negativas, células de *Escherichia*, células de *Pantoea*, células fúngicas, células de fungo filamentoso, células de *Trichoderma*, células de *Aspergillus*, ou células de levedura.

9. Método, de acordo com a reivindicação 8, em que as células são selecionadas do grupo que consiste em *Bacillus subtilis, Streptomyces lividans, Streptomyces coelicolor, Streptomyces griseus, Escherichia coli, Pantoea citrea, Trichoderma reesei, Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger, Saccharomyces cerevisiae e Yarrowia.*

10. Método para produzir isopreno, o método compreendendo:

(a) cultivar células compreendendo um ou mais ácidos nucleicos que codificam polipeptídeo de isopreno sintase sob condições adequadas para a produção de isopreno; e

(b) produzir isopreno, em que a concentração de fase líquida de isopreno é inferior a cerca de 1 g/L e as células produzem mais que cerca de 400 nmol g_{wcm}/hora de isopreno.

11. Método, de acordo com a reivindicação 10, que compreende adicionalmete recuperar o isopreno.

12. Método, de acordo com a reivindicação 10, em que as células compreendem um ou mais ácidos nucleicos heterólogos ou uma ou mais cópias adicionais de um ácido nucleico endógeno codificando um polipeptídeo de isopreno sintase.

13. Método, de acordo com a reivindicação 10, em que as células compreendem ainda um ou mais ácidos nucleicos heterólogos ou uma ou mais cópias adicionais de um ácido nucleico endógeno codificando um polipeptídeo IDI, uma enzima da via do MVA e uma enzima da via da DXP.

14. Método, de acordo com a reivindicação 13, em que a enzima da via do MVA é mevalonato quinase.

15. Método, de acordo com a reivindicação 10, em que o polipeptídeo de isopreno sintase é um polipeptídio de *Pueraria* ou *Populus* ou de um híbrido, *Populus alba x Populus tremula.*

16. Método, de acordo com a reivindicação 10, em que as células são células bacterianas gram-positivas, células de *Streptomyces*, células bacterianas gram-negativas, células de *Escherichia*, células de *Pantoea*, células fúngicas, células de fungo filamentoso, células de *Trichoderma*, células de *Aspergillus*, ou células de levedura.

17. Método para produzir um composto, em que o composto tem uma ou mais características selecionadas do grupo que consiste em (a) um coeficiente da lei de Henry inferior a cerca de 250M/atm e (b) uma solubilidade em água de menos de cerca de 100 g/L, o método compreendendo:

a) cultivar células compreendendo um ou mais ácidos nucleicos que codificam polipeptídeo de isopreno sintase sob condições adequadas para a produção do composto, em que é adicionado gás em uma taxa de pulverização gasosa entre cerca de 0,01 vvm e cerca de 2 vvm; e

b) produzir o composto.

18. Método, de acordo com a reivindicação 17, que compreende adicionalmete recuperar o composto.

19. Método, de acordo com a reivindicação 17, em que o composto produzido é etileno.

20. Método, de acordo com a reivindicação 17, em que o composto produzido é isopreno.

21. Células em cultura compreendendo um ácido nucleico codificando um polipeptídeo de isopreno sintase, em que as células produzem mais que cerca de 400 nmol g_{wcm}/hora de isopreno e a taxa de evolução de dióxido de carbono das células é maior que cerca de 1×10^{-18} mmol/L/hora.

22. Sistema compreendendo uma câmara de reação com células como definidas na reivindicação 21.

23. Método para produzir um composto, em que o composto tem uma ou mais características selecionadas do grupo que consiste em (a) um coeficiente da lei de Henry inferior a cerca de 250M/atm e (b) uma solubilidade em água de menos de cerca de 100 g/L, o método compreendendo:

a) cultivar células compreendendo um ou mais ácidos nucleicos que codificam polipeptídeo de isopreno sintase sob condições adequadas para a produção do composto, em que. o composto tem uma ou mais características selecionadas do grupo que consiste em (a) um coeficiente da lei de Henry inferior a cerca de 250M/atm e (b) uma solubilidade em água de menos de cerca de 100 g/L;

b) produzir o composto;

c) e recuperar o composto da fase gasosa.

24. Método, de acordo com a reivindicação 23, em que o composto produzido é etileno.

25. Método, de acordo com a reivindicação 23, em que o composto é isopreno.

Fig. 1

1-
*atg*tgtgcgacctcttctcaatttactcagattaccgagcataattcccgtcgttccgcaaactatcagccaaa
cctgtggaatttcgaattcctgcaatccctggagaacgacctgaaagtggaaaagctggaggagaaagc
gaccaaactggaggaagaagttcgctgcatgatcaaccgtgtagacacccagccgctgtcccctgctgga
gctgatcgacgatgtgcagcgcctgggtctgacctacaaatttgaaaaagacatcattaaagccctggaa
aacatcgtactgctggacgaaaacaaaaagaacaaatctgacctgcacgcaaccgctctgtcttccgtct
gctgcgtcagcacggttcgaggttctcaggatgttttgagcgtttcaaggataaagaaggtggttcagcg
gtgaactgaaaggtgacgtccaaggcctgctgagcctgtatgaagcgtcttacctgggtttcgagggtgag
aacctgctggaggaggcgcgtacctttccatcacccacctgaagaacaacctgaaagaaggcattaata
ccaaggttgcagaacaagtgagccacgccctggaactgccatatcaccagcgtctgcaccgtctggagg
cacgttggttcctggataaatacgaaccgaaagaaccgcatcaccagctgctgctggagctggcgaagct
ggattttaacatggtacagaccctgcaccagaaagagctgcaagatctgtcccgctggtggaccgagatg
ggcctggctagcaaactggatttttgtacgcgaccgcctgatggaagtttatttctgggcactgggtatggcgc
cagacccgcagtttggtgaatgtcgcaaagctgttactaaaatgtttggtctggtgacgatcatcgatgacgt
gtatgacgtttatggcactctggacgaactgcaactgttcaccgatgctgtagagcgctgggacgttaacgct
attaacaccctgccggactatatgaaactgtgtttcctggcactgtacaacaccgttaacgacacgtcctatte
tattctgaaagagaaaggtcataacaacctgtcctatctgacgaaaagctggcgtgaactgtgcaaagcct
ttctgcaagaggcgaaatggtccaacaacaaaattatcccggctttctccaagtacctggaaaacgccag
cgtttcctcctccggtgtagcgctgctggcgccgtcttactttccgtatgccagcagcaggaagacatctccg
accacgcgctgcgttccctgaccgacttccatggtctggtgcgttctagctgcgttatcttccgcctgtgcaac
gatctggccacctctgcggcggagctggaacgtggcgagactaccaatttctatcattagctacatgcacga
aaacgatggtaccagcgaggaacaggccgcgaagaactgcgtaaactgatcgacgccgaatggaaa
aagatgaatcgtgaacgcgttagcgactccaccctgctgcctaaagcgttcatggaaatcgcagttaacat
ggcacgtgtttcccactgcacctaccagtatggcgatggtctgggtcgcccagactacgcgactgaaaaacc
gcatcaaaactgctgctgattgacccttcccgattaaccagctgatgtatgtc
taactgcag
(SEQ ID NO:1)

Fig. 2

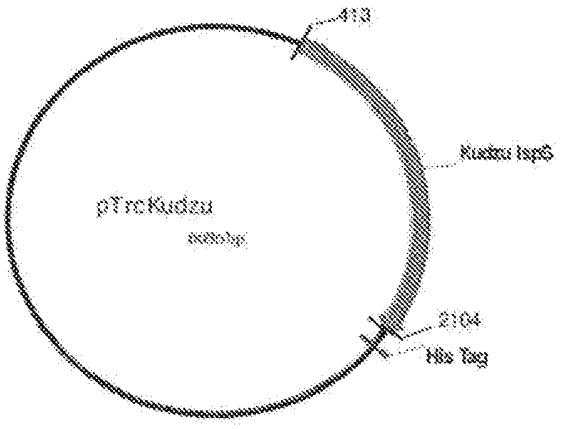


Fig. 3A

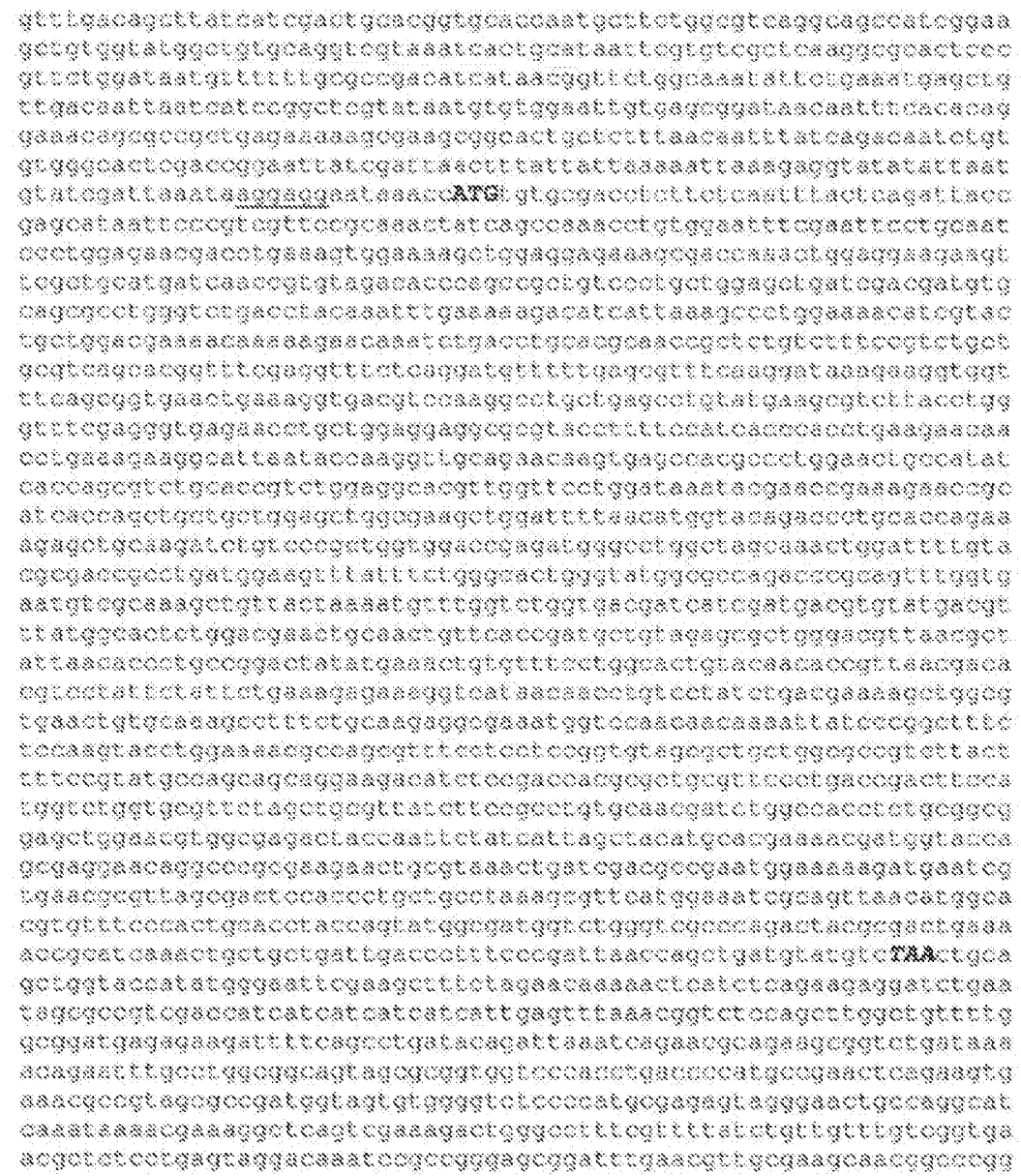


Fig. 3B

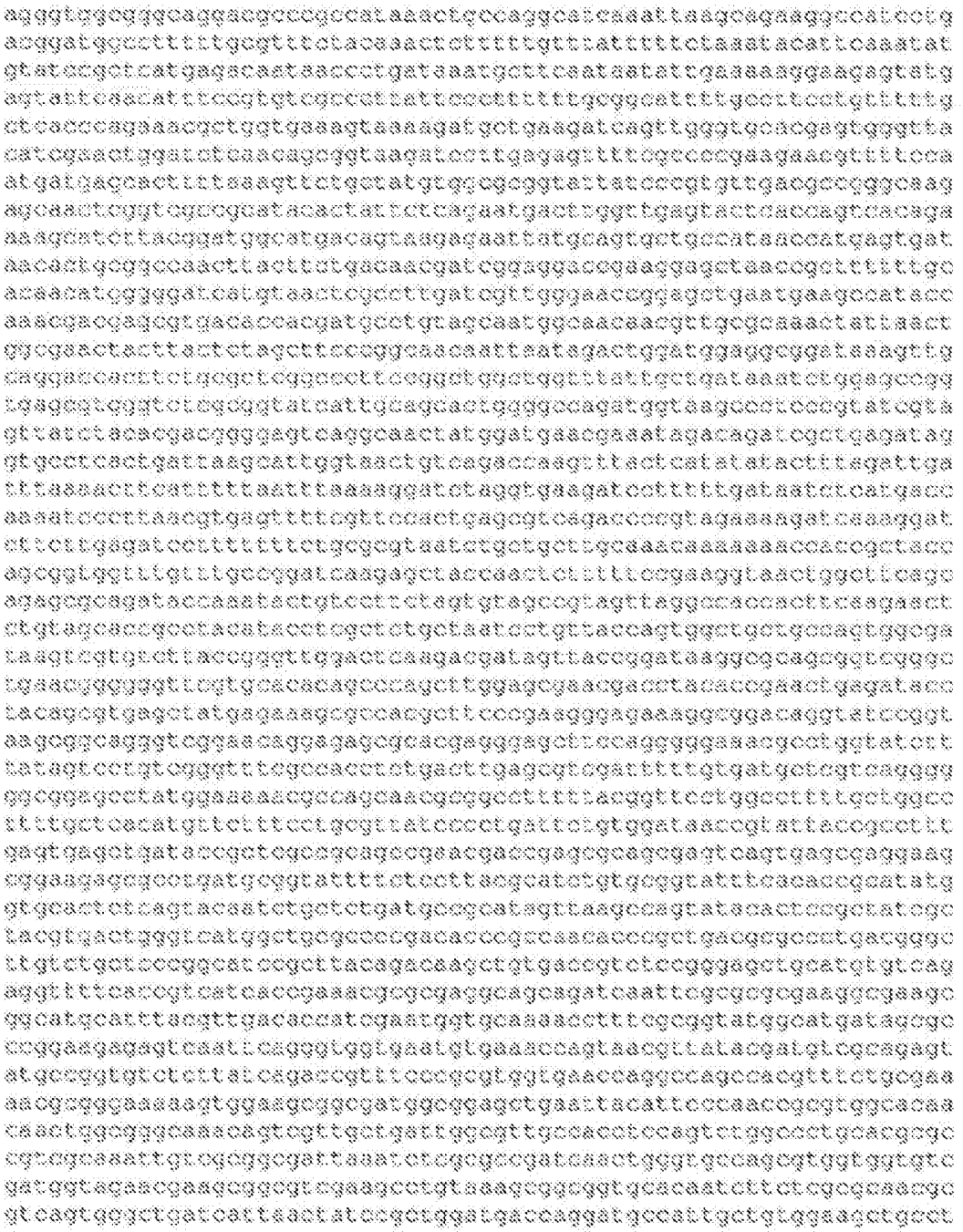


Fig. 3C

Gcactaatgttccggcgttatttcttgatgtctctgaccagacacccatcaacagtattatttt
ctcccatgaagacggtacgcgactgggcgtggagcatctggtcgcattgggtcaccagcaaatc
gcgctgttagcgggcccattaagttctgtctcggcgcgtctgcgtctggctggctggcataaat
atatctcactcgcaatcaaattcagccgatagcggaacgggaaggcgactggagtgccatgtccgg
ttttcaacaaaccatgcaaatgctgaatgagggcatcgttcccactgcgatgctggttgccaac
gatcagatggcgctgggcgcaatgcgcgccattaccgagtccgggctgcgcgttggtgcggata
tctcggtagtgggatacgacgataccgaagacagctcatgttatatcccgccgtcaaccaccat
caaacaggattttcgcctgctggggcaaaccagcgtggaccgcttgctgcaactctctcagggc
caggcggtgaagggcaatcagctgttgcccgtctcactggtgaaaagaaaaaccaccctggcgc
ccaatacgcaaaccgcctctccccgcgcgttggccgattcattaatgcagctggcacgacaggt
ttcccgactggaaagcgggcagtgagcgcaacgcaattaatgtgagttagcgcgaattgatctg
(SEQ ID NO:2)

Fig. 4

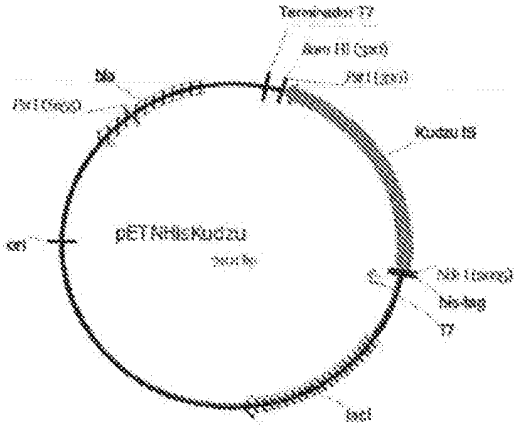


Fig. 5A

1-

ttctcatgtttgacagcttatcatcgataagctttaatgcggtagtttatcacagttaaattgctaacgcagtca
ggcaccgtgtatgaaatctaacaatgcgctcatcgtcatcctcggcaccgtcaccctggatgctgtaggca
taggcttggttatgccggtactgccgggcctcttgcgggatatccggatatagttcctccttcagcaaaaaa
cccctcaagacccgtttagaggccccaaggggttatgctagttattgctcagcggtggcagcagccaact
cagcttcctttcgggctttgttagcagccggatccctgcagttagacatacatcagctggttaatcgggaaa
gggtcaatcagcagcagttgatgcggttttcagtcgcgtagtctgggcgacccagaccatcgccatactg
gtaggtgcagtgggaaacacgtgccatgttaactgcgatttccatgaacgctttaggcagcagggtggag
tcgctaacgcgttcacgattcatcttttccattcggcgtcgatcagttacgcagttcttcgcgggcctgttcct
cgctggtaccatcgtttcgtgcatgtagctaatgatagaattggtagtctcgccacgttccagctccgccgc
agaggtggccagatcgttgcacaggcggaagataacgcagctagaacgcaccagaccatggaagtc
ggtcagggaacgcagcgcgtggtcggagatgtcttcctgctgctggcatacggaaaagtaagacggcg
ccagcagcgctacaccggaggaggaaacgctggcgttttccaggtacttggagaaagccgggataaatti
tgttgttggaccatttcgcctcttgcagaaaggcttgcacagttcacgccagcttttcgtcagataggacag
gttgttatgacctttctcttcagaatagaataggacgtgtcgttaacggtgttgtacagtgccaggaaacac
agtttcatatagtccggcagggtgttaatagcgttaacgtcccagcgctctacagcatcggtgaacagttgc
agttcgtccagagtgccataaacgtcatacacgtcatcgatgatcgtcaccagaccaaacatttttagtaac
agctttgcgacattcaccaaactgcgggtctggcgccataccagtgcccagaaataaacttccatcagg
cggtcgcgtacaaaatccagtttgctagccaggcccatctcggtccaccagcgggacagatcttgcagct
ctttctggtgcagggtctgtaccatgttaaaatccagcttcgccagctccagcagcagctggtgatgcggtt
ctttcggttcgtatttatccaggaaccaacgtgcctccagacggtgcagacgctggtgatatggcagttcca
gggcgtggctcacttgttctgcaaccttggtattaatgccttctttcaggttgttcttcaggtgggtgatggaaa
aggtacgcgcctcctccagcaggttctcaccctcgaaacccaggtaagacgcttcatacaggctcagca
ggccttggacgtcacctttcagttcaccgctgaaaccaccttcttatccttgaaacgctcaaaaacatcctg
agaaacctcgaaaccgtgctgacgcagcagacggaaagacagagcggttgcgtgcaggtcagatttgt
tcttttgttttcgtccagcagtacgatgtttttccagggctttaatgatgtcttttttcaaatttgtaggtcagaccca
ggcgctgcacatcgtcgatcagctccagcagggacagcggctgggtgtctacacggttgatcatgcagc
gaacttcttcctccagttggtcgctttctcctccagctttttccacttttcaggtcgttctccagggattgcaggaat
tcgaaattccacaggtttggctgatagttttgcggaacgacgggaattatgctcggtaatctgagtaaaattga
gaagaggtcgcacacatatgacgaccttcgatatggccgctgctgtgatgatgatgatgatgatgatgatg
atggcccatggtatatctccttcttaaagttaaacaaaattatttctagagggaattgttatccgctcacaatt
ccccctatagtgagtcgtattaatttcgcgggatcgagatctcgatcctctacgccggacgcatcgtggccgg
catcaccggcgccacaggtgcggttgctggcgcctatatcgccgacatcaccgatggggaagatcggg
ctcgccacttcgggctcatgagcgcttgtttcggcgtgggtatggtggcaggccccgtggccgggggact
gttgggcgccatctccttgcatgcaccattccttgcggcggcggtgctcaacggcctcaacctactactgg
gctgcttcctaatgcaggagtcgcataagggagagcgtcgagatccccggacaccatcgaatggcgcaa
aacctttcgcggtatggcatgatagcgcccggaagagagtcaattcagggtggtgaatgtgaaaccagt
aacgttatacgatgtcgcagagtatgccggtgtctcttatcagaccgtttcccgcgtggtgaaccaggcca
gccacgtttctgcgaaaacgcgggaaaaagtggaagcggcgatggcggagctgaattacattcccaac
cgcgtggcacaacaactggcgggcaaacagtcgttgctgattggcgttgccacctccagtctggccctgc
acgcgccgtcgcaaattgtcgcggcgattaaatct

Fig. 5B

cgcgccgatcaactgggtgccagcgtggtggtgtcgatggtagaacgaagcggcgtcgaagcctgta
aagcggcggtgcacaatcttctcgcgcaacgcgtcagtgggctgatcattaactatccgctggatgacc
aggatgccattgctgtggaagctgcctgcactaatgttccggcgttatttcttgatgtctctgaccagacac
ccatcaacagtattatttttctcccatgaagacggtacgcgactgggcgtggagcatctggtcgcattgggt
caccagcaaatcgcgctgttagcgggcccattaagttctgtctcggcgcgtctgcgtctggctggctggc
ataaatatctcactcgcaatcaaattcagccgatagcggaacgggaaggcgactggagtgccatgtcc
ggttttcaacaaaccatgcaaatgctgaatgagggcatcgttcccactgcgatgctggttgccaacgatc
agatggcgctgggcgcaatgcgcgccattaccgagtccgggctgcgcgttgtgcggatatctcggta
gtgggatacgacgataccgaagacagctcatgttatatcccgccgttaaccaccatcaaacaggatttt
cgcctgctggggcaaaccagcgtggaccgcttgctgcaactctctcagggccaggcggtgaagggca
atcagctgttgcccgtctcactggtgaaaagaaaaaccaccctggcgcccaatacgcaaaccgcctct
ccccgcgcgttggccgattcattaatgcagctggcacgacaggtttcccgactggaaagcgggcagtg
agcgcaacgcaattaatgtaagttagctcactcattaggcaccgggatctcgaccgatgcccttgagag
ccttcaacccagtcagctccttccggtgggcgcggggcatgactatcgtcgccgcacttatgactgtcttc
tttatcatgcaactcgtaggacaggtgccggcagcgctctgggtcattttcggcgaggaccgctttcgctg
gagcgcgacgatgatcggcctgtcgcttgcggtattcggaatcttgcacgccctcgctcaagccttcgtc
actggtcccgccaccaaacgtttcggcgagaagcaggccattatcgccggcatggcggccgacgcg
ctgggctacgtcttgctggcgttcgcgacgcgaggctggatggccttccccattatgattcttctcgcttccg
gcggcatcgggatgcccgcgttgcaggccatgctgtccaggcaggtagatgacgaccatcagggaca
gcttcaaggatcgctcgcggctcttaccagcctaacttcgatcactggaccgctgatcgtcacggcgattt
atgccgcctcggcgagcacatggaacgggttggcatggattgtaggcgccgccctataccttgtctgcct
ccccgcgttgcgtcgcggtgcatggagccgggccacctcgacctgaatggaagccggcggcacctcg
ctaacggattcaccactccaagaattggagccaatcaattcttgcggagaactgtgaatgcgcaaacc
aaccctggcagaacatatccatcgcgtccgccatctccagcagccgcacgcggcgcatctcgggca
gcgttgggtcctggccacgggtgcgcatgatcgtgctcctgtcgttgaggacccggctaggctggcggg
gttgccttactggttagcagaatgaatcaccgatacgcgagcgaacgtgaagcgactgctgctgcaaa
acgtctgcgacctgagcaacaacatgaatggtcttcggtttccgtgtttcgtaaagtctggaaacgcgga
agtcagcgccctgcaccattatgttccggatctgcatcgcaggatgctgctggctaccctgtggaacacc
tacatctgtattaacgaagcgctggcattgaccctgagtgatttttctctggtcccgccgcatccataccgc
cagttgtttaccctcacaacgttccagtaaccgggcatgttcatcatcagtaacccgtatcgtgagcatcct
ctctcgtttcatcggtatcattacccccatgaacagaaatcccccttacacggaggcatcagtgaccaaa
caggaaaaaaccgcccttaacatggcccgctttatcagaagccagacattaacgcttctggagaaactc
aacgagctggacgcggatgaacaggcagacatctgtgaatcgcttcacgaccacgctgatgagctttt
accgcagctgcctcgcgcgtttcggtgatgacggtgaaaacctctgacacatgcagctcccggagacg
gtcacagcttgtctgtaagcggatgccgggagcagacaagcccgtcagggcgcgtcagcgggtgttg
gcgggtgtcgggcgcagccatgacccagtcacgtagcgatagcggagtgtatactggcttaactatg
cggcatcagagcagattgtactgagagtgcaccatatatgcggtgtgaaataccgcacagatgcgtaa
ggagaaaataccgcatcaggcgctcttccgcttcctcgctcactgactcgctgcgctcggtcgttcggctg
cggcgagcggtatcagctcactcaaaggcggtaatacggttatccacagaatcaggggataacgcag
gaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcgttgctggc
gttttccataggctccgcccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcaga

Fig. 5C

ggtggcgaaacccgacaggactataaagataccaggcgtttccccctggaagctccctcgtgcgctctcct
gttccgaccctgccgcttaccggatacctgtccgcctttctcccttcgggaagcgtggcgctttctcatagctca
cgctgtaggtatctcagttcggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaaccccccgttcagc
ccgaccgctgcgccttatccggtaactatcgtcttgagtccaacccggtaagacacgacttatcgccactgg
cagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcggtgctacagagttcttgaagtggtg
gcctaactacggctacactagaaggacagtatttggtatctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaa
aagagttggtagctcttgatccggcaaacaaaccaccgctggtagcggtggtttttttgtttgcaagcagcag
attacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctacggggtctgacgctcagtggaac
gaaaactcacgttaagggattttggtcatgagattatcaaaaaggatcttcacctagatccttttaaattaaaaa
atgaagttttaaatcaatctaaagtatatatgagtaaacttggtctgacagttaccaatgcttaatcagtgagg
cacctatctcagcgatctgtctatttcgttcatccatagttgcctgactccccgtcgtgtagataactacgatacg
ggagggcttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagacccacgctcaccggctccagatttat
cagcaataaaccagccagccggaagggccgagcgcagaagtggtcctgcaactttatccgcctccatcc
agtctattaattgttgccgggaagctagagtaagtagttcgccagttaatagtttgcgcaacgttgttgccattg
ctgcaggcatcgtggtgtcacgctcgtcgtttggtatggcttcattcagctccggttcccaacgatcaaggcg
agttacatgatcccccatgttgtgcaaaaaagcggttagctccttcggtcctccgatcgttgtcagaagtaagt
tggccgcagtgttatcactcatggttatggcagcactgcataattctcttactgtcatgccatccgtaagatgctt
tttctgtgactggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgtatgcggcgaccgagttgctcttgcccgg
cgtcaacacgggataataccgcgccacatagcagaactttaaaagtgctcatcattggaaaacgttcttcg
gggcgaaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcgatgtaacccactcgtgcacccaactg
atcttcagcatcttttactttcaccagcgtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaa
agggaataagggcgacacggaaatgttgaatactcatactcttccttttcaatattattgaagcatttatcagg
gttattgtctcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataaacaaatagggggttccgcgcacattt
ccccgaaaagtgccacctgacgtctaagaaaccattattatcatgacattaacctataaaaataggcgtatc
acgaggccctttcgtcttcaagaa

(SEQ ID NO:5)

Fig. 6

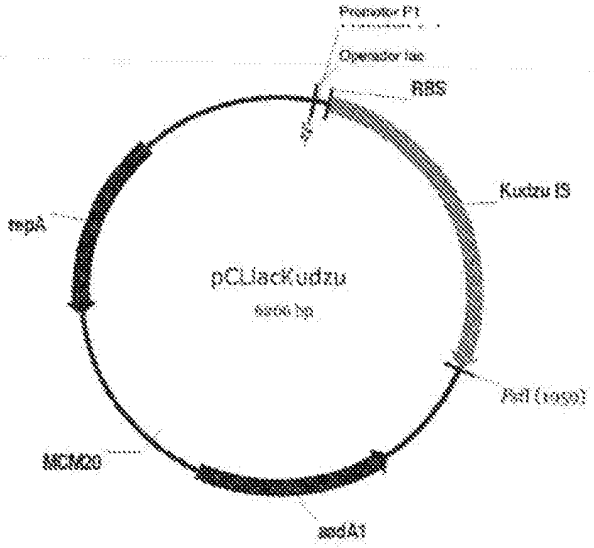


Fig. 7A

1-

cccgtcttactgtcgggaattcgcgttggccgattcattaatgcagctggcacgacaggtttcccgactggaa
agcgggcagtgagcgcaacgcaattaatgtgagttagctcactcattaggcaccccaggctttacacttlat
gcttccggctcgtatgttgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagctatgaccatgat
tacgccaagcttgtatcgattaaataaggaggaataaaccatgtgtgcgacctcttctcaatttactcagatta
ccgagcataattcccgtcgttccgcaaactatcagccaaaacctgtggaatttcgaattcctgcaatcctgga
gaacgacctgaaagtggaaaagctggaggagaaagcgaccaaactggaggaagaagttcgctgcatg
atcaaccgtgtagacacccagccgctgtccctgctggagctgatcgacgatgtgcagcgcctgggtctgac
ctacaaatttgaaaaagacatcattaaagccctggaaaacatcgtactgctggacgaaaacaaaaagaa
caaatctgacctgcacgcaaccgctctgtctttccgtctgctgcgtcagcacggtttcgaggtttctcaggatgt
ttttgagcgtttcaaggataaagaagggtggtttcagcggtgaactgaaaggtgacgtccaaggcctgctga
gcctgtatgaagcgtcttacctgggtttcgagggtgagaacctgctggaggaggcgcgtaccttttccatcac
ccacctgaagaacaacctgaaagaaggcattaataccaaggttgcagaacaagtgagccacgccctgg
aactgccatatcaccagcgtctgcaccgtctggaggcacgttggttcctggataaatacgaaccgaaaga
accgcatcaccagctgctgctggagctggcgaagctggatttaacatggtacagaccctgcaccagaaa
gagctgcaagatctgtcccgctggtggaccgagatgggcctggctagcaaactggatttttgtacgcgaccg
cctgatggaagtttatttctgggcactgggtatggcgccagacccgcagtttggtgaatgtcgcaaagctgtt
actaaaatgtttggtctggtgacgatcatcgatgacgtgtatgacgtttatggcactctggacgaactgcaact
gttcaccgatgctgtagagcgctgggacgttaacgctattaacaccctgccggactatatgaaactgtgttlc
ctggcactgtacaacaccgttaacgacacgtcctatttctattctgaaagagaaaggtcataacaacctgtcc
tatctgacgaaaagctggcgtgaactgtgcaaagccttctgcaagaggcgaaatggtccaacaacaaa
attatcccggctttctccaagtacctggaaaacgccagcgtttcctcctcggtgtagcgctgctggcgccgt
cttacttttccgtatgccagcagcaggaagacatctccgaccacgcgctgcgttcccctgaccgacttccatg
gtctggtgcgttctagctgcgttatcttccgcctgtgcaacgatctggccacctctgcggcggagctggaacgt
ggcgagactaccaatttctatcattagctacatgcacgaaaacgatggtaccagcgaggaacaggcccgc
gaagaactgcgtaaactgatcgacgccgaatggaaaaagatgaatcgtgaacgcgttagcgactccacc
ctgctgcctaaagcgttcatggaaatcgcagttaacatggcacgtgtttcccactgcacctaccagtatggc
gatggtctgggtcgcccagactacgcgactgaaaaccgcatcaaactgctgctgattgacccttttccgatt
aaccagctgatgtatgtctaactgcaggtcgactctagaggatccccgggtaccgagctcgaattcactgg
ccgtcgttttacaacgtcgtgactgggaaaaccctggcgttacccaacttaatcgccttgcagcacatcccc
ctttcgccagctggcgtaatagcgaagaggcccgcaccgatcgcccttcccaacagttgcgcagcctgaa
tggcgaatggcgcctgatgcggtattttctccttacgcatctgtgcggtatttcacaccgcatatggtgcactct
cagtacaatctgctctgatgccgcatagttaagccagccccgacacccgccaacacccgctgacgagctt
agtaaagccctcgctagattttaatgcggatgttgcgattacttcgccaactattgcgataacaagaaaaag
ccagcctttcatgatatatctcccaatttgtgtagggcttattatgcacgcttaaaaataataaaagcagacttg
acctgatagtttggctgtgagcaattatgtgcttagtgcatctaacgcttgagttaagccgcgccgcgaagcg
gcgtcggcttgaacgaattgttagacattatttgccgactaccttggtgatctcgccttcacgtagtggacaaa
ttcttccaactgatctgcgcgcgaggccaagcgatcttcttgtccaagataagcctgtctagcttcaagtat
gacgggctgatactgggccggcaggcgctccattgcccagtcggcagcgacatccttcggcgcgatttgc
cggttactgcgctgtaccaaatgcgggacaacgtaagcactacatttcgctcatcgccagcccagtcgggc
ggcgagttccatag

Fig. 7B

cgttaaggtttcatttagcgcctcaaatagatcctgttcaggaaccggatcaaagagttcctccgccgctg
gacctaccaaggcaacgctatgttctcttgcttttgtcagcaagatagccagatcaatgtcgatcgtggct
ggctcgaagatacctgcaagaatgtcattgcgctgccatttctccaaaattgcagttcgcgcttagctggata
acgccacggaatgatgtcgtcgtgcacaacaatggtgacttctacagcgcggagaatctcgctctctcc
agggaagccgaagtttccaaaaggtcgttgatcaaagctcgccgcgttgtttcatcaagccttacggtc
accgtaaccagcaaatcaatatcactgtgtggcttcaggccgccatccactgcggagccgtacaaatgt
acggccagcaacgtcggttcgagatggcgctcgatgacgccaactacctctgatagttgagtcgatact
tcggcgatcaccgcttccctcatgatgtttaactttgtttagggcgactgcccctgctgcgtaacatcgttgct
gctccataacatcaaacatcgacccacggcgtaacgcgcttgctgcttggatgcccgaggcatagact
gtaccccaaaaaaaacagtcataacaagccatgaaaaccgccactgcgccgttaccaccgctgcgttc
ggtcaaggttctggaccagttgcgtgagcgcatacgctacttgcattacagcttacgaaccgaacaggc
ttatgtccactgggttcgtgccttcatccgtttccacggtgtgcgtcacccggcaaccttgggcagcagcg
aagtcgaggcatttctgtcctggctggcgaacgagcgcaaggtttcggtctccacgcatcgtcaggcatt
ggcggccttgctgttcttctacggcaaggtgctgtgcacggatctgccctggcttcaggagatcggaaga
cctcggccgtcgcggcgcttgccggtggtgctgaccccggatgaagtggttcgcatcctcggtttctgga
aggcgagcatcgtttgttcgcccagcttctgtatggaacgggcatgcggatcagtgagggtttgcaactg
cgggtcaaggatctggatttcgatcacggcacgatcatcgtcgcgggagggcaagggctccaaggatc
gggccttgatgttacccgagagcttggcacccagcctgcgcgagcaggggaattaatcccacgggttt
tgctgcccgcaaacgggctgttctggtgttgctagtttgttatcagaatcgcagatccggcttcagccggttt
gccggctgaaagcgctatttcttccagaattgccatgattttttccccacgggaggcgtcactggctccgt
gttgtcggcagcttgattcgataagcagcatcgcctgtttcaggctgtctatgtgtgactgttgagctgtaa
caagttgtctcaggtgttcaatttcatgttctagttgctttgttttactggtttcacctgttctattaggtgttacatg
ctgttcatctgttacattgtcgatctgttcatggtgaacagctttgaatgcaccaaaaactcgtaaaagctct
gatgtaatctatcttttttacaccgtttcatctgtgcatatggacagttttccctttgatatgtaacggtgaacagt
tgttctacttttgtttgttagtcttgatgcttcactgatagatacaagagccataagaacctcagatccttccgt
atttagccagtatgttctctagtgtggttcgttgttttgcgtgagccatgagaacgaaccattgagatcatac
ttacttgcatgtcactcaaaaatttttgcctcaaaactggtgagctgaatttttgcagttaaagcatcgtgtag
tgttttcttagtccgttatgtagtggaggaatctgatgtaatggttgttggtatttttgtcaccattcatttttatctggt
tgttctcaagttcggttacgagatccatttgtctatctagttcaacttggaaaatcaacgtatcagtcgggcg
gcctcgcttatcaaccaccaatttcatattgctgtaagtgtttaaatctttacttattggtttcaaaacccattgg
ttaagccttttaaactcatggtagttatttttcaagcattaacatgaacttaaattcatcaaggctaatctctata
tttgccttgtgagttttcttttgtgttagttcttttaataaccactcataaatcctcatagagtattgtttcaaaag
acttaacatgttccagattatattttatgaatttttttaactggaaaagataaggcaatatctcttcactaaaa
actaatctaatttttcgcttgagaacttggcatagtttgtccactggaaaatctcaaagcctttaaccaaag
gatcctgatttccacagttctcgtcatcagctctctggttgctttagctaatacaccataagcatttcccttact
gatgttcatcatctgagcgtattggttataagtgaacgataccgtccgttctttccttgtagggttttcaatcgt
ggggttgaggtagtgccacacagcataaaattagcttggtttcatgctccgttaagtcatagcgactaatcg
ctagttcatttgctttgaaaacaactaattcagacatacatctcaattggtctaggtgattttaatcactatac
caattgagatgggctagtcaatgataattactagtccttttcctttgagttgtgggtatctgta

Fig. 7C

Aattctgctagaccttlgctggaaaacttgtaaattctgctagaccctctgtaaattccgctagaccttlgtg
tgttttttttgtttatattcaagtggttataatttatagaataaagaaagaataaaaaaagataaaaaagaat
agatcccagccctgtgtataactcactactttagtcagttccgcagtattacaaaaggatgtcgcaaac
gctgtttgctcctctacaaaacagaccttaaaaccctaaaggcttaagtagcaccctcgcaagctcgg
gcaaatcgctgaatattccttttgtctccgaccatcaggcacctgagtcgctgtctttttcgtgacattcagtt
cgctgcgctcacggctctggcagtgaatgggggtaaatggcactacaggcgccttttatggattcatgc
aaggaaactacccataatacaagaaaagcccgtcacgggcttctcagggcgttttatggcgggtctg
ctatgtggtgctatctgactttttgctgttcagcagttcctgccctctgattttccagtctgaccacttcggatta
tcccgtgacaggtcattcagactggctaatgcacccagtaaggcagcggtatcatcaacaggctta

(SEQ ID NO:7)

Fig. 8A

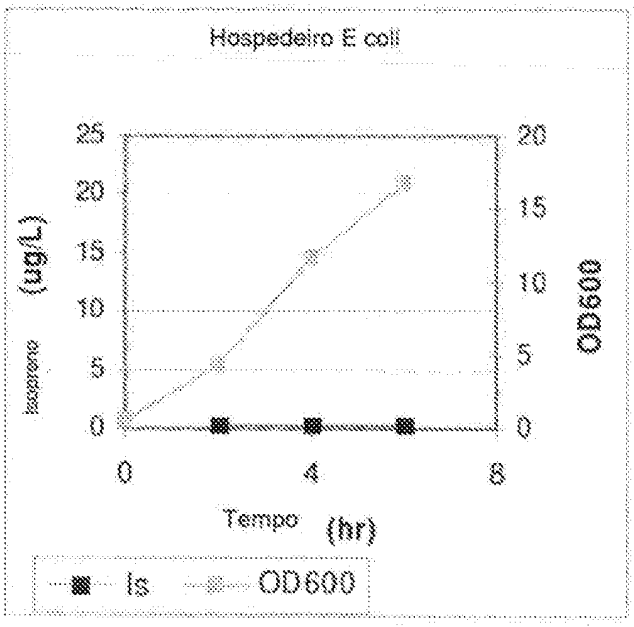

Hospedeiro E coli
25
20
15
10
5
0
Isoprene (ug/L)
20
15
10
5
0
OD600
0
4
8
Tempo (hr)
Is
OD600

Fig. 8B

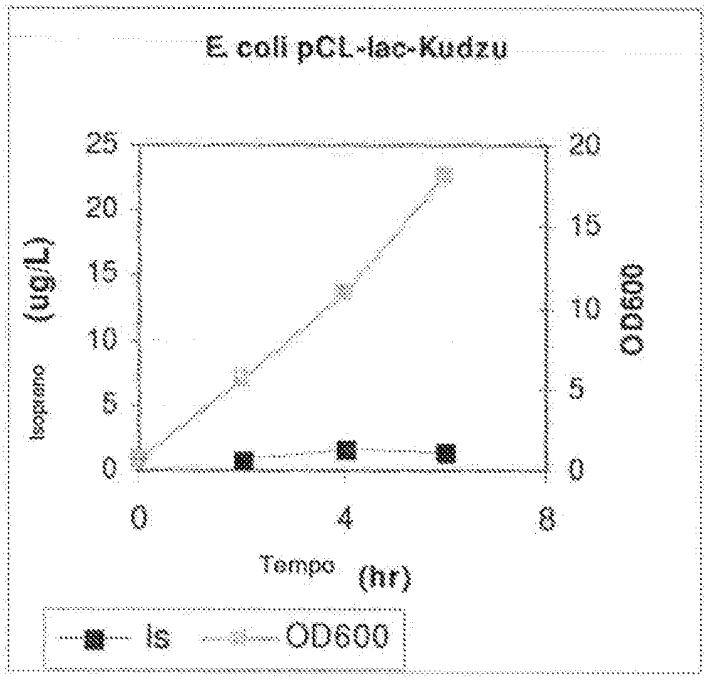

E. coli pCL-lac-Kudzu
Isoprene (ug/L)
OD600
Tempo (hr)
Is
OD600
0
4
8
0
5
10
15
20
25

Fig. 8C

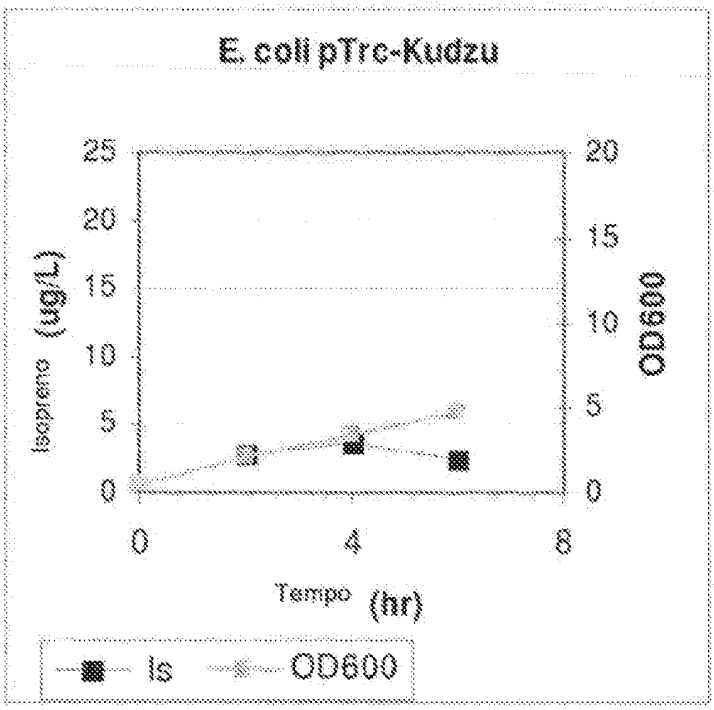

E. coli pTrc-Kudzu
Isopreno (ug/L)
OD600
25
20
15
10
5
0
20
15
10
5
0
0
4
8
Tempo (hr)
Is
OD600

Fig. 8D

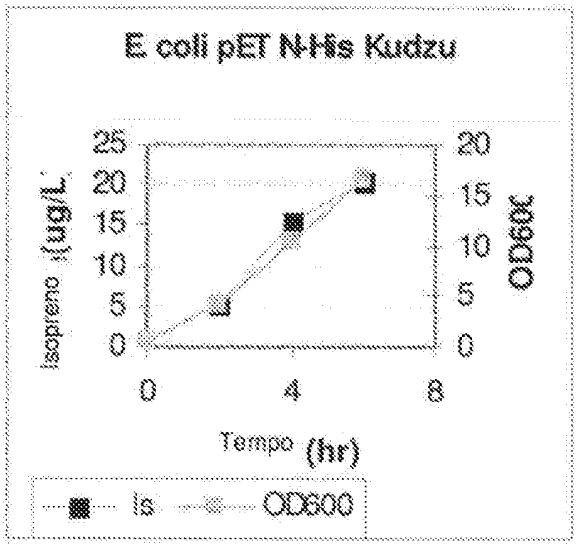

E coli pET N-His Kudzu
Isopreno (ug/L)
25
20
15
10
5
0
OD600
20
15
10
5
0
0
4
8
Tempo (hr)
Is
OD600

Fig. 9A

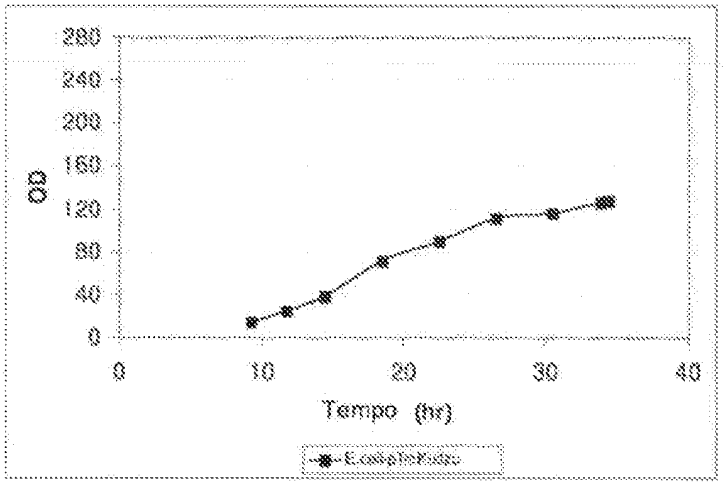


Fig. 9B

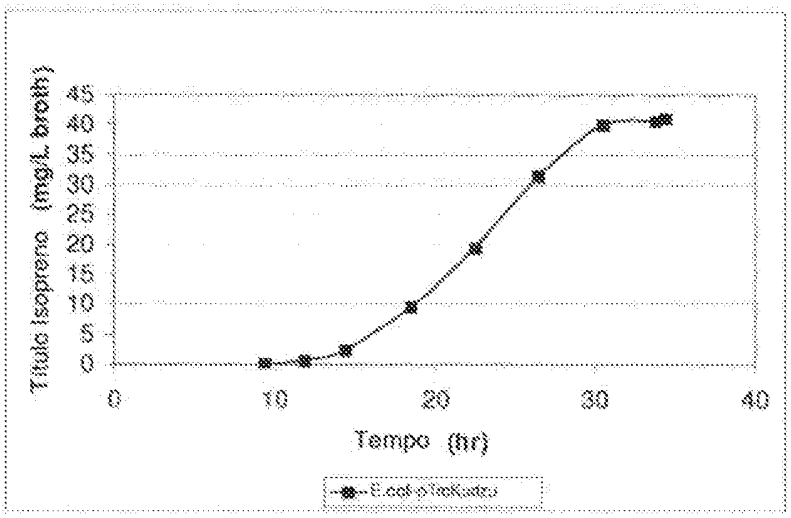

Titolo Isoprene (mg/L broth)
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
0
10
20
30
40
Tempo (hr)

Fig. 10B

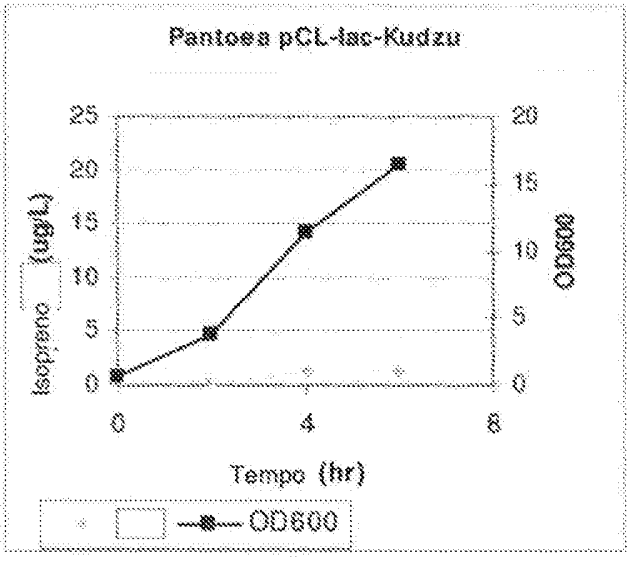

Pantoea pCL-lac-Kudzu
25
20
15
10
5
0
Isoprene (ug/L)
20
15
10
5
0
OD600
0
4
8
Tempo (hr)
OD600

Fig. 10C

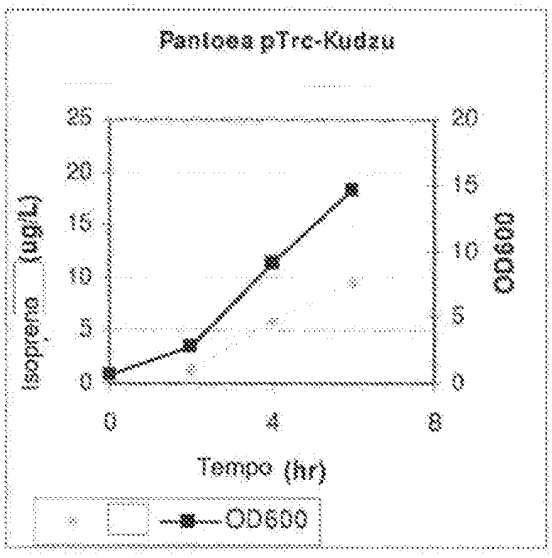

Pantoea pTrc-Kudzu
Isoprene (ug/L)
OD600
Tempo (hr)
0
4
8
0
5
10
15
20
25
OD600

Fig. 11

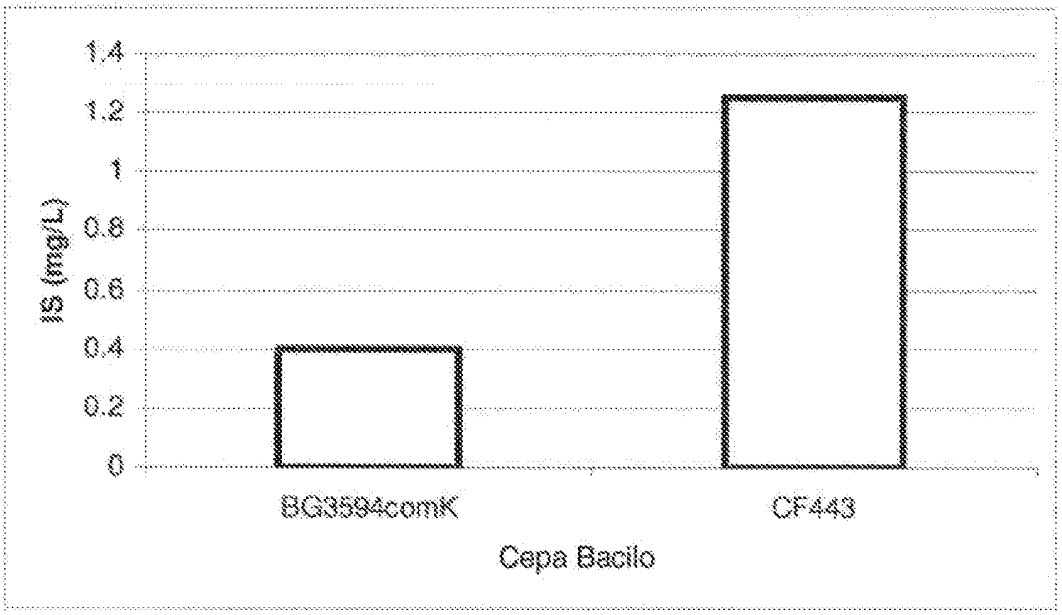


Fig. 12A

1
gaattgctccatttttcttctgctatcaaaataacagactcgtgatttttccaaacgagctttcaaaaaagcctctgcc
ccttgcaaatcggatgcctgtctataaaattcccgatattggttaaacagcggcgcaatggcggccgcatctgat
gtctttgcttggcgaatgttcatcttatttcttcctccctctcaataatttttttcattctatccctttttctgtaaagtttatttttc
agaatactttttatcatcatgcttttgaaaaaatatcacgataatatccattgttctcacggaagcacacgcaggtca
tttgaacgaatttttttcgacaggaatttgccgggactcaggagcatttaacctaaaaaaagcatgacatttcagcat
aatgaacatttactcatgtctatttcgttcttttctgtatgaaaatagttatttcgagtctctacggaaatagcgagag
atgatatacctaaatagagataaaatcatctcaaaaaaaatgggtctactaaaatattattccatctattacaataa
attcacagaatagtcttttaagtaagtctactctgaatttttttaaaaggagagggtaaagagtgtgtgcgacctctt
ctcaatttactcagattaccgagcataattcccgtcgttccgcaaactatcagccaaacctgtggaatttcgaatt
cctgcaatccctggagaacgacctgaaagtggaaaagctggaggagaaagcgaccaaactggaggaag
aagttcgctgcatgatcaaccgtgtagacacccagccgctgtccctgctggagctgatcgacgatgtgcagcg
cctgggtctgacctacaaatttgaaaaagacatcattaaagccctggaaaacatcgtactgctggacgaaaa
caaaaagaacaaatctgacctgcacgcaaccgctctgtctttccgtctgctgcgtcagcacggtttcgaggtttc
tcaggatgttttgagcgtttcaaggataaagaagggtggttcagcggtgaactgaaaggtgacgtccaaggcc
igctgagcctgtatgaagcgtcttacctgggtttcgagggtgagaacctgctggaggaggcgcgtacctttcca
tcacccacctgaagaacaacctgaaagaaggcattaataccaaggttgcagaacaagtgagccacgccct
ggaactgccatatcaccagcgtctgcaccgtctggaggcacgttggttcctggataaatacgaaccgaaaga
accgcatcaccagctgctgctggagctggcgaagctggatttaacatggtacagaccctgcaccagaaaga
gctgcaagatctgtcccgctggtggaccgagatgggcctggctagcaaactggattttgtacgcgaccgcctg
atggaagtttatttctgggcactgggtatggcgccagacccgcagttiggtgaatgtcgcaaagctgttactaaa
atgtttggtctggtgacgatcatcgatgacgtgtatgacgtttatggcactctggacgaactgcaactgttcaccg
atgctgtagagcgctgggacgttaacgctattaacaccctgccggactatatgaaactgtgtttcctggcactgt
acaacaccgttaacgacacgtcctatictatictgaaagagaaaggtcataacaacctgtcctatctgacgaaa
agctggcgtgaactgtgcaaagccttctgcaagaggcgaaatggtccaacaacaaaattatcccggcttttctc
caagtacctggaaaacgccagcgtttcctcctccgggtgtagcgctgctggcgccgtcttactttccgtatgccag
cagcaggaagacatctccgaccacgcgctgcgttccctgaccgacttccatggtctggtgcgttctagctgcgtt
atcttccgcctgtgcaacgatctggccacctctgcggcggagctggaacgtggcgagactaccaattctatcat
tagctacatgcacgaaaacgatggtaccagcgaggaacaggcccgcgaagaactgcgtaaactgatcgac
gccgaatggaaaaagatgaatcgtgaacgcgttagcgactccaccctgctgcctaaagcgttcatggaaatc
gcagttaacatggcacgtgtttcccactgcacctaccagtatggcgatggtctgggtcgcccagactacgcga
ctgaaaaccgcatcaaactgctgctgattgacccttttccgattaaccagctgatgtatgtctaaaaaaaaaccg
gccttggcccccgccggttttttattatttttcttcctccgcatgttcaatccgctccataatcgacggatggctccctct
gaaaattttaacgagaaacggcgggttgacccggctcagtcccgtaacggccaagtcctgaaacgtctcaat
cgccgcttcccggtttccggtcagctcaatgccgtaacggtcggcggcgtttttcctgataccgggagacggcatt
cgtaatcggatcctctagagtcgacctgcaggcatgcaagcttggctgcgcgtttcggtgatgacggtgaaa
acctctgacacatgcagctcccggagacggtcacagcttgtctgtaagcggatgccgggagcagacaagcc
cgtcagggcgcgtcagcgggtgttggcgggtgtcggggcgcagccatgacccagtcacgtagcgata

Fig. 12B

gcggagtgtatactggcttaactatgcggcatcagagcagattgtactgagagtgcaccatatgcggtgt
gaaataccgcacagatgcgtaaggagaaaataccgcatcaggcgctcttccgcttcctcgctcactga
ctcgctgcgctcggtcgttcggctgcggcgagcggtatcagctcactcaaaggcggtaatacggttatcc
acagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaac
cgtaaaaaggccgcgttgctggcgtttttccataggctccgcccccctgacgagcatcacaaaaatcga
cgctcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataaagataccaggcgtttccccctggaagct
ccctcgtgcgctctcctgttccgaccctgccgcttaccggatacctgtccgccttctcccttcgggaagcgt
ggcgctttctcaatgctcacgctgtaggtatctcagttcggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtg
cacgaaccccccgttcagcccgaccgctgcgccttatccggtaactatcgtcttgagtccaacccggta
agacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcg
gtgctacagagttcttgaagtggtggcctaactacggctacactagaaggacagtatttggtatctgcgct
ctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaacaaaccaccgctggt
agcggtggtttttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgat
cttttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggattttggtcatgagattatcaa
aaaggatcgaagtcggttcagaaaaagaaggatatggatctggagctgtaatataaaaaccttcttcaa
ctaacggggcaggttagtgacattagaaaaccgactgtaaaaagtacagtcggcattatctcatattata
aaagccagtcattaggcctatctgacaattcctgaatagagttcataaacaatcctgcatgataaccatc
acaaacagaatgatgtacctgtaaagatagcggtaaatatattgaattacctttattaatgaatttcctgct
gtaataatgggtagaaggtaattactattattattgatatttaagttaaacccagtaaatgaagtccatgga
ataatagaaaagagaaaaagcatttcaggtataggtgtttttgggaaacaatttaaaagaaccattatattt
ctctacatcagaaaggtataaatcataaaactctttgaagtcatttcttacaggagtccaaataccagag
aatgttttagatacaccatcaaaaattgtataaagtggctctaacttatcccaataacctaactctccgtcg
ctattgtaaccagttctaaaagctgtatttgagtttatcaccctttgtcactaagaaaatataatgcagggtaa
aatttatatccttcttgttttatgtttcggtataaaacactaatatcaatttctgtggttatactaaaagtcgtttgtt
ggttcaaataatgattaaatatctcttttctcttccaattgtctaaatcaatttttattaaagttcatttgatatgcct
cctaaatttttatctaaagtgaatttaggaggcttactgtctgctttcttcattagaatcaatccttttttaaagtc
aatattactgtaacataaatatatatttttaaaaatatcccacttatccaatttcgtttgttgaactaatgggtg
ctttagttgaagaataaagaccacattaaaaaatgtggtctttgtgtttttttaaaggatttgagcgtacgcg
aaaaatccttttcttttcttttcttatcttgataataagggtaactattgccggttgtccattcatggctgaatctgc
ttcctctgttgacatgacacacatcatctcaatatccgaatagggcccatcagtctgacgaccaagagag
ccataaacaccaatagccttaacatcatccccatatttatccaatattcgttccttaatttcatgaacaatctt
catcttttcttctctagtcattattattggtccattcactattctcattccctttttcagataatttttagattgctttttcta
aataagaatatttggagagcaccgttcttattcagctattaataactcgtcttcctaagcatccttcaatcctttt
taataacaattatagcatctaatcttcaacaaactggcccgttgttgaactactcttaataaaataatttttttc
cgttcccaattccacattgcaataatagaaaatccatcttcatcggcttttttcgtcatcatctgtatgaatcaaa
atcgccttcttctgtgtcatcaaggtttaatttttttatgtatttcttttaacaaaccaccataggagattaacctttt
acggtgtaaaccttcctccaaatcagacaaacgtttcaaatttcttttcttcatcatcggtcataaaatccgta
tcctttacaggatatttttgcagtttcgtcaattgccgattgtatatccgatttatatttatttttttcggtcgaatcattt
gaacttttacatttggatcatagtctaatttcattgccttttttccaaaattgaatccattgttt

Fig. 12C

ttgattcacgtagttttctgttattctaaaataagttggttccacacataccattacatgcatgtgctgattata
agaattatcttattatttattgtcacatccgttgcacgcataaaaccaacaagatttttattaatttttttatatt
gcatcattcggcgaaatccttgagccatatctgtcaaactcttatttaattcttcgccatcataaacatttttta
actgttaatgtgagaaacaaccaacgaactgttggctttgtttaataacttcagcaacaacctttgtgac
tgaatgccatgtttcattgctctcctccagttgcacattggacaaagcctggatttgcaaaaccacactcg
ataccacttttcttcgcctgtttcacgatttgtttatactctaatatttcagcacaatctttactctttcagcctt
ttaaattcaagaatatgcagaagttcaaagtaatcaacattagcgatttttctttctctccatggtctcactt
tccacttttgtcttgtccactaaaaccctgatttttcatctgaataaatgctactattaggacacataatatt
aaaagaaaccccccatctatttagttatttgtttagtcacttataacttaacagatggggttttctgtgcaac
caatttaagggtttcaatacttaaaacacatacataccaacacttcaacgcaccttcagcaactaa
aataaaaatgacgttatttctatatgtatcaagataagaaagaacaagttcaaaaccatcaaaaaaaag
acacctttcaggtgcttttttatttttataaactcattccctgatctcgacttcgttcttttttacctctcggttatg
agttagttcaaattcgttcttttttaggttctaaatcgtgttttcttggaattgtgctgttttatcctttaccttgtcta
caaacccccttaaaaaacgttttttaaaggcttttaagccgtctgtacgttcctaag

(SEQ ID NO:57)

Fig. 13

ATGTGTGCAACCTCCTCCCAGTTTACTCAGATTACCGAGCATAATTCT
CGACGATCTGCTAACTACCAGCCGAACCTTTGGAACTTTGAGTTTCT
CCAGTCTCTCGAAAATGACCTGAAGGTGGAAAAGCTCGAGGAGAAG
GCGACCAAACTCGAGGAGGAGGTGCGATGTATGATCAACAGAGTTG
ACACCCAACCCCTGTCTTTGCTGGAGCTGATCGACGATGTGCAGCG
GTTGGGTTTGACTTATAAATTCGAGAAGGACATTATCAAGGCACTGG
AGAACATTGTGCTCCTCGACGAGAACAAGAAGAACAAGTCTGATCTT
CACGCTACCGCTCTCTCTTTCCGACTTCTTCGACAACACGGCTTCGA
GGTGTCGCAGGACGTCTTCGAGAGATTTAAGGACAAGGAGGGAGGA
TTTAGCGGCGAGCTGAAGGGAGACGTTCAGGGTCTTCTCTCCTTGT
ACGAGGCGTCCTACCTGGGATTCGAGGGAGAGAACCTCCTGGAGG
AAGCTCGTACATTTTCCATCACTCACCTTAAGAATAACCTTAAGGAGG
GAATTAACACCAAGGTGGCCGAGCAGGTTTCTCACGCCCTGGAGCT
CCCCTACCACCAACGGCTCCATAGACTGGAGGCTCGTTGGTTCCTG
GACAAATATGAGCCAAAGGAGCCTCATCATCAGTTGCTGTTGGAGTT
GGCCAAGCTGGACTTCAATATGGTTCAGACGCTGCACCAAAAGGAG
TTGCAGGACCTGTCTCGATGGTGGACCGAGATGGGATTGGCCTCGA
AGCTGGATTTTGTCCGTGACCGACTTATGGAGGTCTATTTTTGGGCC
CTTGGAATGGCGCCTGACCCCCAGTTCGGAGAGTGCCGGAAGGCG
GTGACGAAGATGTTCGGTCTTGTGACTATCATCGACGACGTCTACGA
TGTCTACGGCACACTCGACGAGTTGCAGCTGTTCACTGACGCCGTC
GAGCGATGGGATGTGAACGCCATTAATACTCTCCCTGACTATATGAA
GCTGTGCTTCCTGGCTCTGTACAACACTGTCAACGATACCTCGTACT
CTATCCTCAAGGAGAAGGGACACAACAATCTCTCCTACTTGACCAAA
TCCTGGCGAGAACTGTGCAAGGCTTTTCTGCAGGAGGCTAAATGGT
CCAATAACAAGATCATTCCTGCTTTTTCTAAATACCTGGAAAATGCCT
CGGTGTCGAGCTCTGGCGTCGCCCTTCTGGCCCCTTCCTACTTCTC
CGTCTGCCAGCAGCAGGAGGATATTTCCGATCATGCTCTTAGATCGC
TGACCGATTTTCACGGCCTCGTGCGATCTTCCTGCGTGATTTTTCGG
TTGTGTAATGACCTTGCGACCTCTGCTGCTGAGCTGGAACGAGGCG
AGACTACAAATTCCATTATTTCTTACATGCACGAAAACGATGGAACAT
CTGAAGAACAGGCTAGAGAGGAACTGCGAAAGTTGATCGACGCCGA
GTGGAAGAAGATGAACAGAGAGCGGGTGTCCGACTCTACCCTGCTT
CCCAAGGCCTTCATGGAGATCGCCGTGAACATGGCTCGAGTTTCCC
ATTGTACTTACCAGTACGGTGACGGCCTGGGTCGTCCGGACTACGC
TACAGAGAACCGAATCAAGCTGCTGCTCATCGACCCCTTCCCTATCA
ACCAATTGATGTACGTGTAA

(SEQ ID NO:8)

Fig. 14

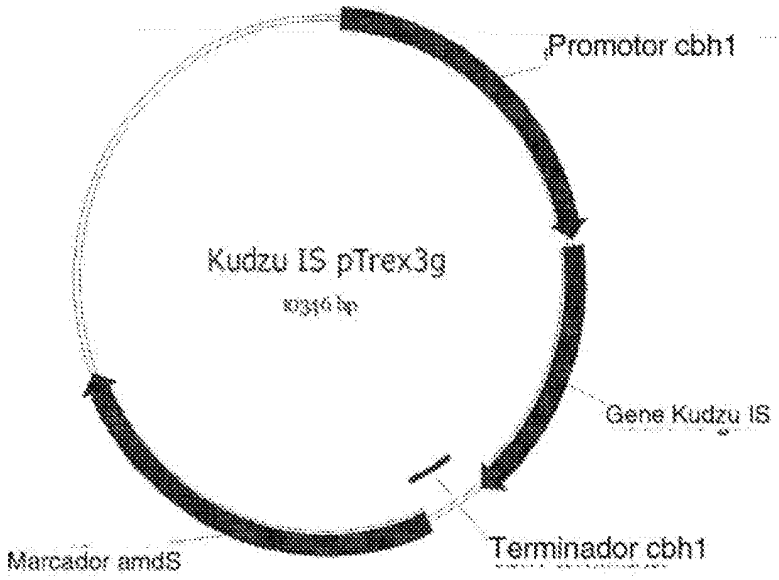

Promotor cbh1
Kudzu IS pTrex3g
Gene Kudzu IS
Terminador cbh1
Marcador amdS

Fig. 15A

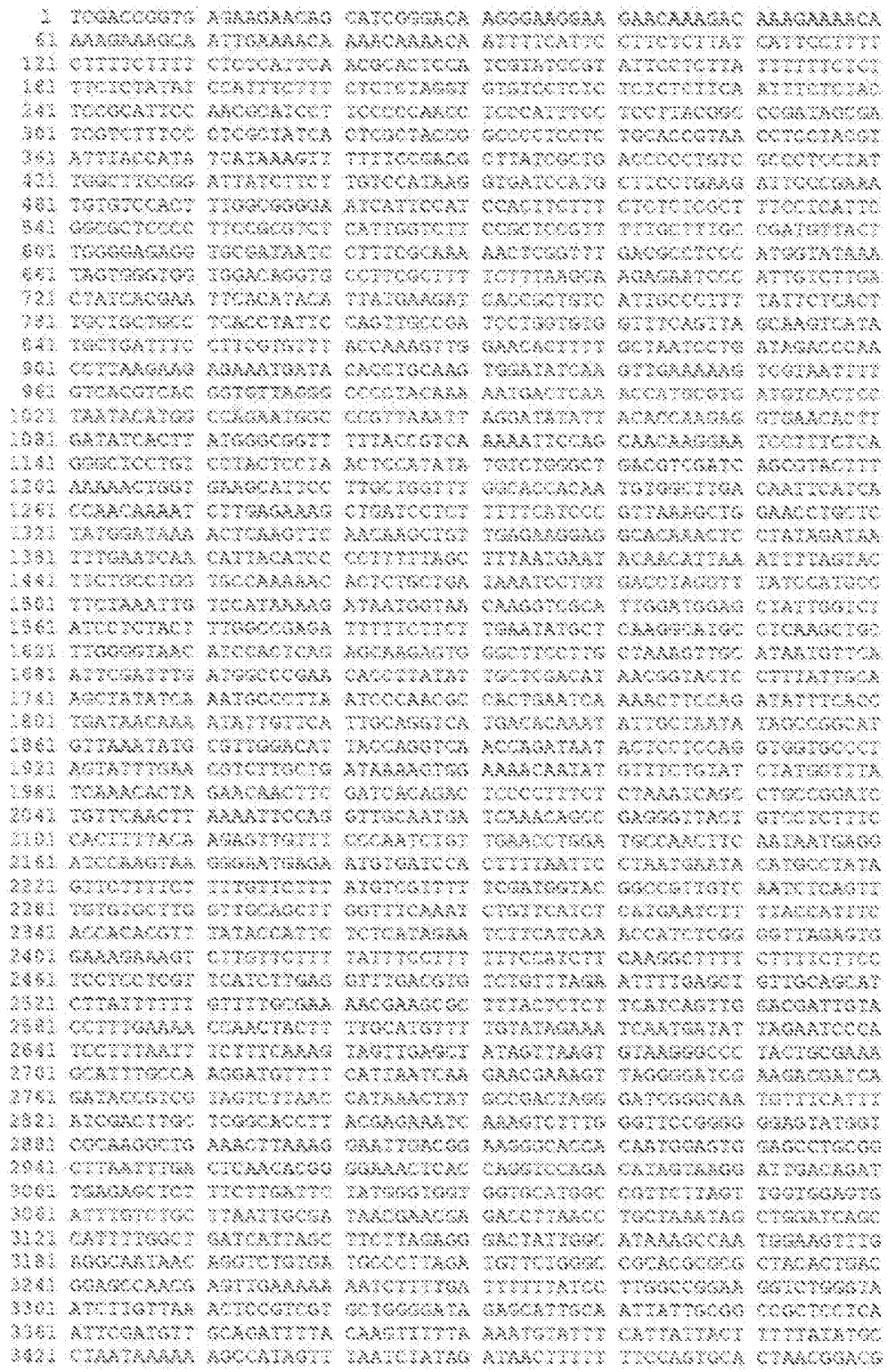


Fig. 15B



Fig. 15C

```
7021 ATCTCGTCGT GATCCATGGC GATGCCTGCT TGCCGAATAT CATGGTGGAA AATGGCCGCT
7081 TTTCTGGATT CAACGACTGT GGCCGGCTGG GTGTGGCGGA CCGCTATCAG GACATAGCGT
7141 TGCATACCCG TGATATTGCT GAAGAGCTTG GCGGCGAATG GGCTGACCGC TTCCTCGTGC
7201 TTTACGGTAT CGCCGCTCCC GATTCGCAGC GCATCGCCTT CTATCGCCTT CTTGACGAGT
7261 TCTTCTGAAT TGAAAAAGGT ACCAAGTTTA CTCATATATA CTTTAGATTG ATTTAAAACT
7321 TCATTTTTAA TTTAAAAGGA TCTAGGTGAA GATCCTTTTT GATAATCTCA TGACCAAAAT
7381 CCCTTAACGT GAGTTTTCGT TCCACTGAGC GTCAGACCCC GTAGAAAAGA TCAAAGGATC
7441 TTCTTGAGAT CCTTTTTTTC TGCGCGTAAT CTGCTGCTTG CAAACAAAAA AACCACCGCT
7501 ACCAGCGGTG GTTTGTTTGC CGGATCAAGA GCTACCAACT CTTTTTCCGA AGGTAACTGG
7561 CTTCAGCAGA GCGCAGATAC CAAATACTGT CCTTCTAGTG TAGCCGTAGT TAGGCCACCA
7621 CTTCAAGAAC TCTGTAGCAC CGCCTACATA CCTCGCTCTG CTAATCCTGT TACCAGTGGC
7681 TGCTGCCAGT GGCGATAAGT CGTGTCTTAC CGGGTTGGAC TCAAGACGAT AGTTACCGGA
7741 TAAGGCGCAG CGGTCGGGCT GAACGGGGGG TTCGTGCACA CAGCCCAGCT TGGAGCGAAC
7801 GACCTACACC GAACTGAGAT ACCTACAGCG TGAGCATTGA GAAAGCGCCA CGCTTCCCGA
7861 AGGGAGAAAG GCGGACAGGT ATCCGGTAAG CGGCAGGGTC GGAACAGGAG AGCGCACGAG
7921 GGAGCTTCCA GGGGGAAACG CCTGGTATCT TTATAGTCCT GTCGGGTTTC GCCACCTCTG
7981 ACTTGAGCGT CGATTTTTGT GATGCTCGTC AGGGGGGCGG AGCCTATGGA AAAACGCCAG
8041 CAACGCGGCC TTTTTACGGT TCCTGGCCTT TTGCTGGCCT TTTGCTCACA TGTTCTTTCC
8101 TGCGTTATCC CCTGATTCTG TGGATAACCG TATTACCGCC TTTGAGTGAG CTGATACCGC
8161 TCGCCGCAGC CGAACGACCG AGCGCAGCGA G
```

(SEQ ID NO:11)

Fig. 16

```
   1 GAATTCAAAA CAAAATGTGT GCAACCTCCT CCCAGTTTAC TCAGATTACC GAGCATAATT
  61 CTCGACGATC TGCTAACTAC CAGCCGAACC TTTGGAACTT TGAGTTTCTC CAGTCTCTCG
 121 AAAATGACCT GAAGGTGGAA AAGCTCGAGG AGAAGCGAAC CAAACTCGAG GAGGAGGTGC
 181 GATGTATGAT CAACAGAGTT GACACCCAAC CCCTGTCTTT GCTGGAGCTG ATCGACGATG
 241 TGCAGCGGTT GGGTTTGACT TATAAATTCG AGAAGGACAT TATCAAGGCA CTGGAGAACA
 301 TTGTGCTCCT CGACGAGAAC AAGAAGAACA AGTCTGATCT TCACGCTACC GCTCTCTCTT
 361 TCCGACTTCT TTGACAACAC GGCTTCGAGG TGTCGCAGGA CGTCTTCGAG AGATTTAAGG
 421 ACAAGGAGGG AGGATTTAGC GGCGAGCTGA AGGAGACGGT TCAGGCTCTT CTCTCCTTGT
 481 ACGAGGCGTC CTACCTGGGA TTCGAGGGAG AGAACCTCCT GGAGGAAGCT CGTACATTTT
 541 CCATCACTCA CCTTAAGAAT AACCTTAAGG AGGGAATTAA CACCAAGGTG GCCGAGCAGG
 601 TTTCTCACGC CCTGGAGCTC CCCTACCACC AACGGCTCCA TAGACTGGAG GCTCGTTGGT
 661 TCCTGGACAA ATATGAGCCA AAGGAGCCTC ATCATCAGTT GCTGTTGGAG TTGGCCAAGC
 721 TGGACTTCAA TATGGTTCAG ACGCTGCACC AAAAGGAGTT GCAGGACCTG TCTCGATGGT
 781 GGACCGAGAT GGGATTGGCC TCGAAGCTGG ATTTTGTCCG TGACCGACTT ATGGAGGTCT
 841 ATTTTGGGGC CCTTGGAATG GCGCCTGACC CCCAGTTCGG AGAGTGCCGG AAGGCGGTGA
 901 CGAAGATGTT CGGTCTTGTG ACTATCATCG ACGACGTCTA CGATGTCTAC GGCACACTCG
 961 ACGAGTTGCA GCTGTTCACT GACGCCGTCG AGCGATGGGA TGTGAACGCC ATTAATACTC
1021 TCCCTGACTA TATGAAGCTG TGCTTCCTGG CTCTGTACAA CACTGTCAAC GATACCTCGT
1081 ACTCTATCCT CAAGGAGAAG GGACACAACA AICTCTCCTA CTTGACCAAA TCCTGGCGAG
1141 AACTGTGCAA GGCTTTTCTG CAGGAGGCTA AATGGTCCAA TAACAAGATC ATTCCTGCTT
1201 TTTCTAAATA CCTGGAAAAT GCCTCGGTGT CGAGCTCTGC CGTCGCCCTT CTGGCCCCTT
1261 CCTACTTCTC CGTCTGCCAG CAGCAGGAGG ATATTTCCGA TCATGCTCTT AGATCGCTGA
1321 CCGATTTTCA CGGCCTCGTG CGATCTTCCT GCGTGATTTT TCGGTTGTGT AATGACCTTG
1381 CGACCTCTGC TGCTGAGCTG GAACGAGGCG AGACTACAAA TTCCATTATT TCTTACATGC
1441 ACGAAAACGA TGGAACATCT GAAGAACAGG CTAGAGAGGA ACTGCGAAAG TTGATCGACG
1501 CCGAGTGGAA GAAGATGAAC AGAGAGCGGG TGTCCGACTC TACCCTGCTT CCCAAGGCCT
1561 TCATGGATAT CGCCGTGAAC ATGGCICGAG TTTCCCATTN TACTTACCAG TACGGTGACG
1621 GCCTGGGTCG TCCGGACTAC GCTACAGAGA ACCGAATCAA GCTGCTGCTC ATCGACCCCT
1681 TCCCTATCAA CCAATTGATG TACGTGTAAT AGTCTAGAGG AICC
```

(SEQ ID NO:12)

Fig. 17



(SEQ ID NO:13)

Fig. 18A

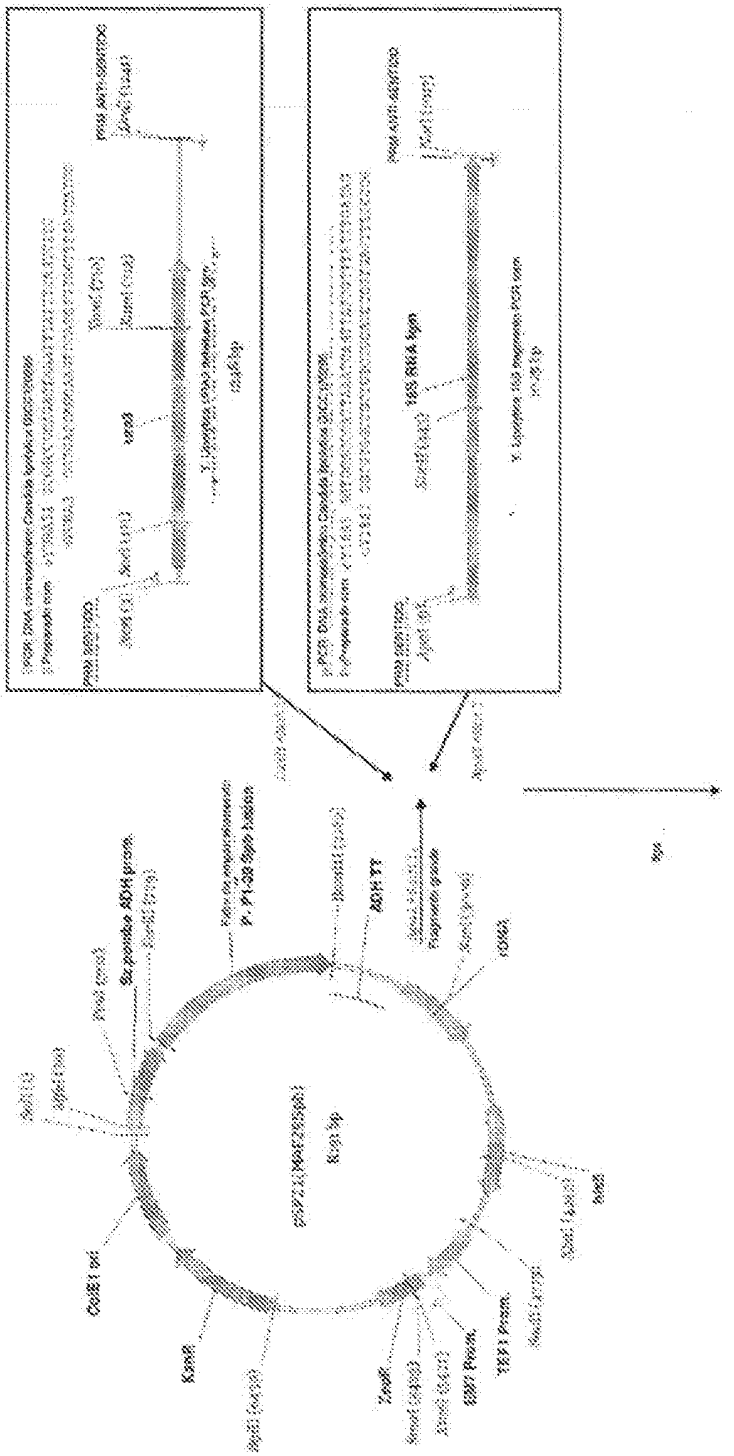


Fig. 18B

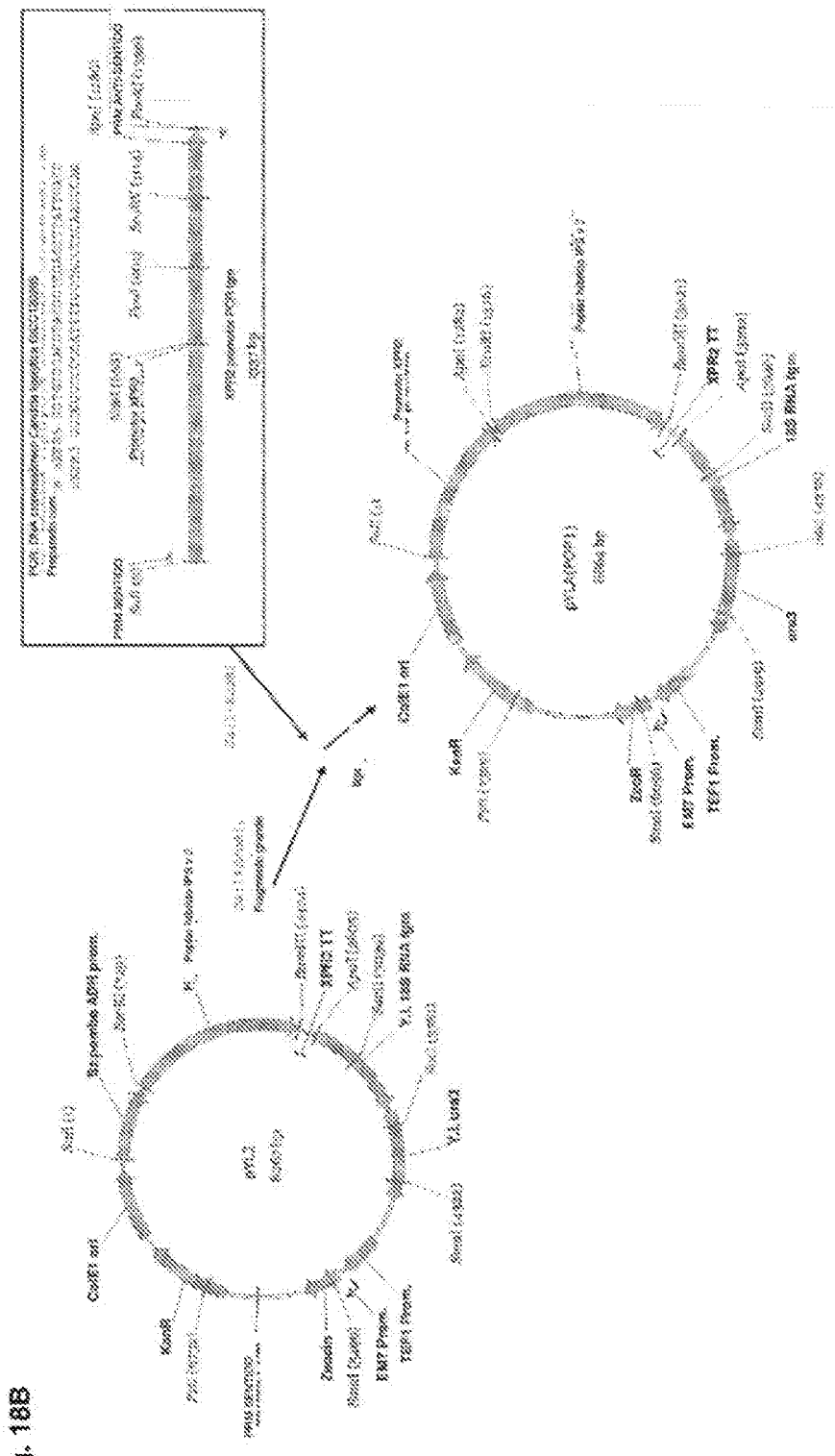


Fig. 18C

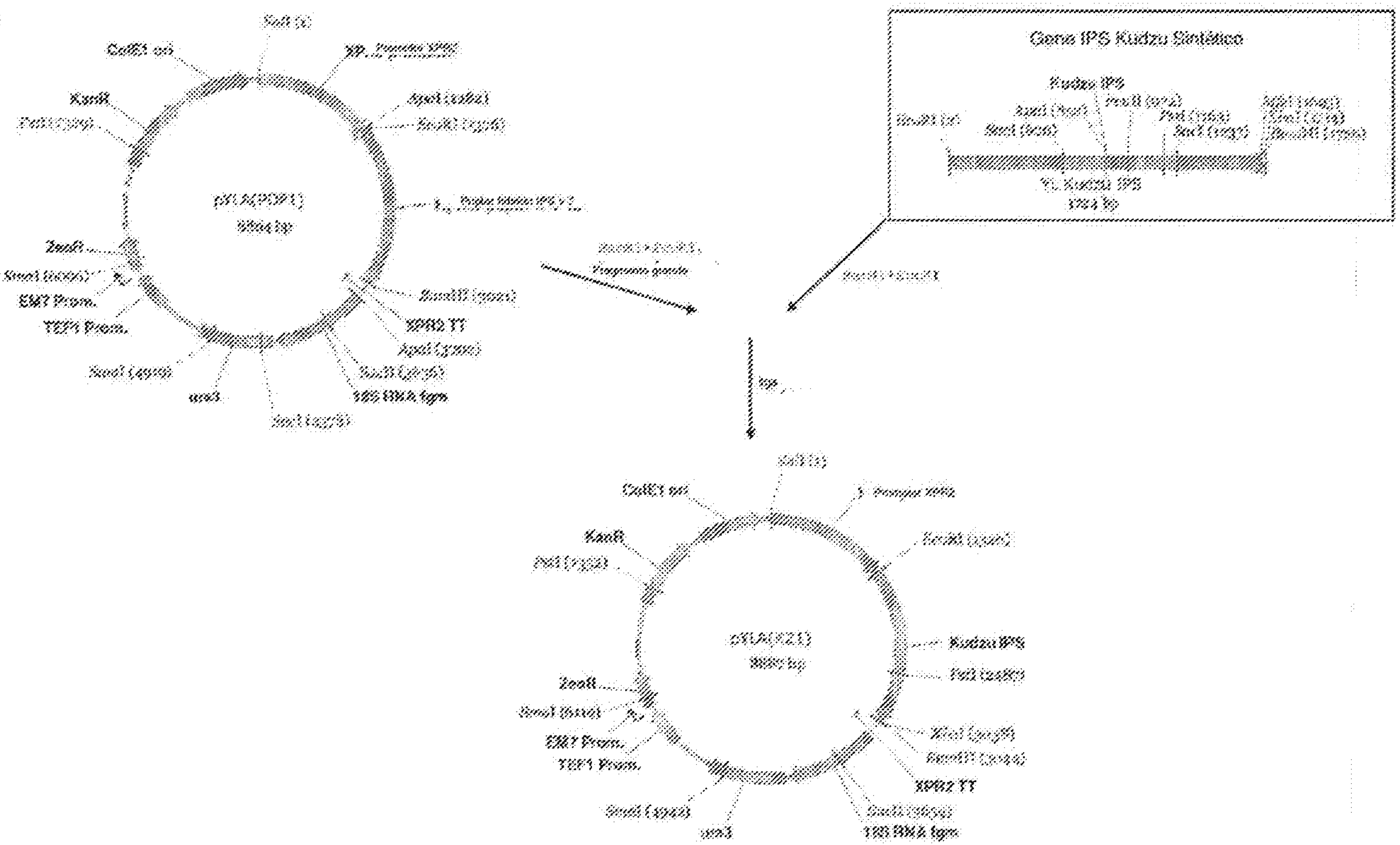
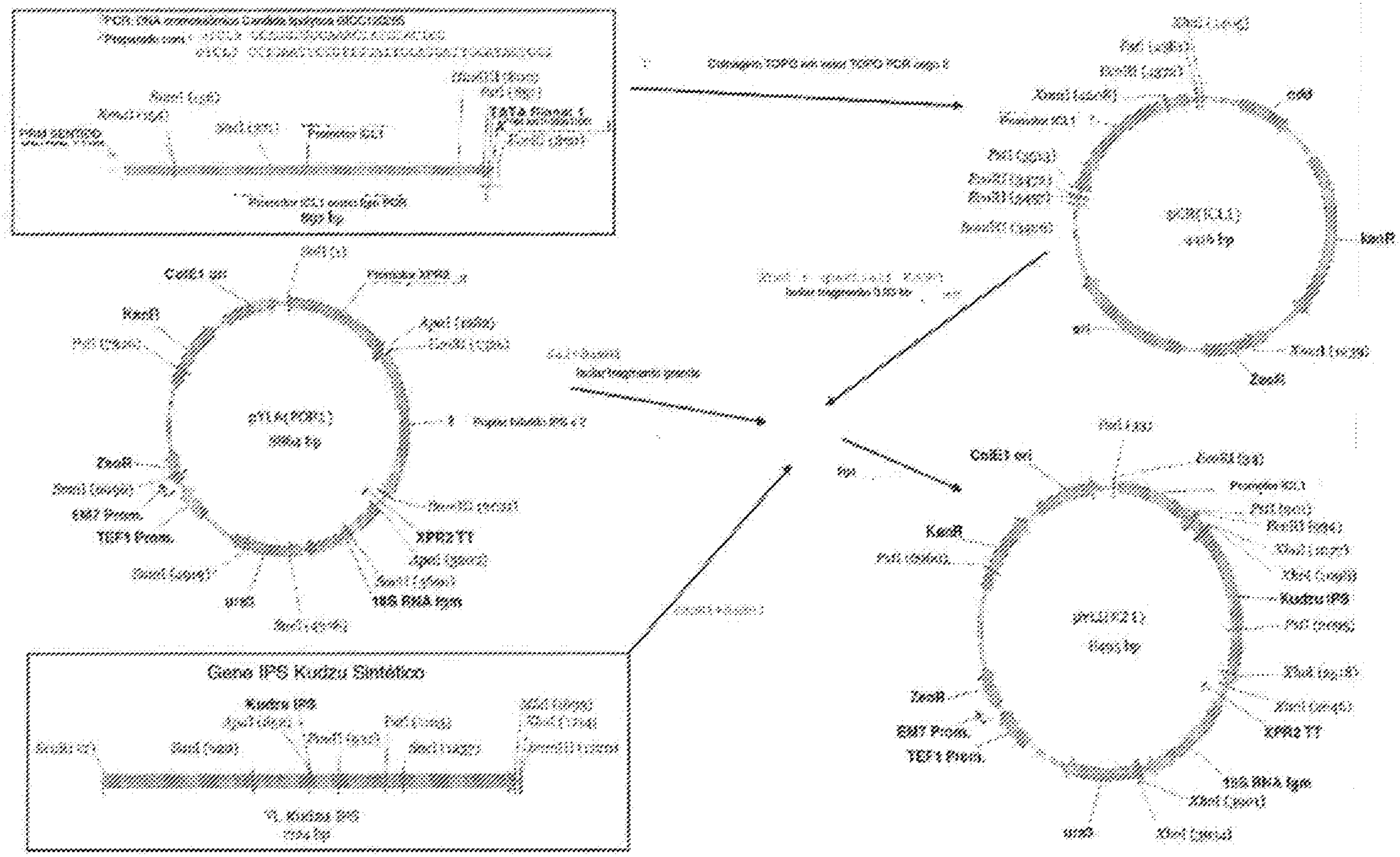

Gene IPS Kudzu Sintético
Kudzu IPS
CoIE1 ori
KanR
ZeoR
EM7 Prom.
TEF1 Prom.
XPR2 TT
18S RNA fgm
pYLA(POP1)
pYLA(KZ1)
Kudzu IPS
CoIE1 ori
KanR
ZeoR
EM7 Prom.
TEF1 Prom.
XPR2 TT
18S RNA fgm

Fig. 18D


Gene IPS Kudzu Sintético
Kudzu IPS
ColE1 ori
KanR
ZeoR
EM7 Prom.
TEF1 Prom.
XPR2 TT
18S RNA fgm
Kudzu IPS

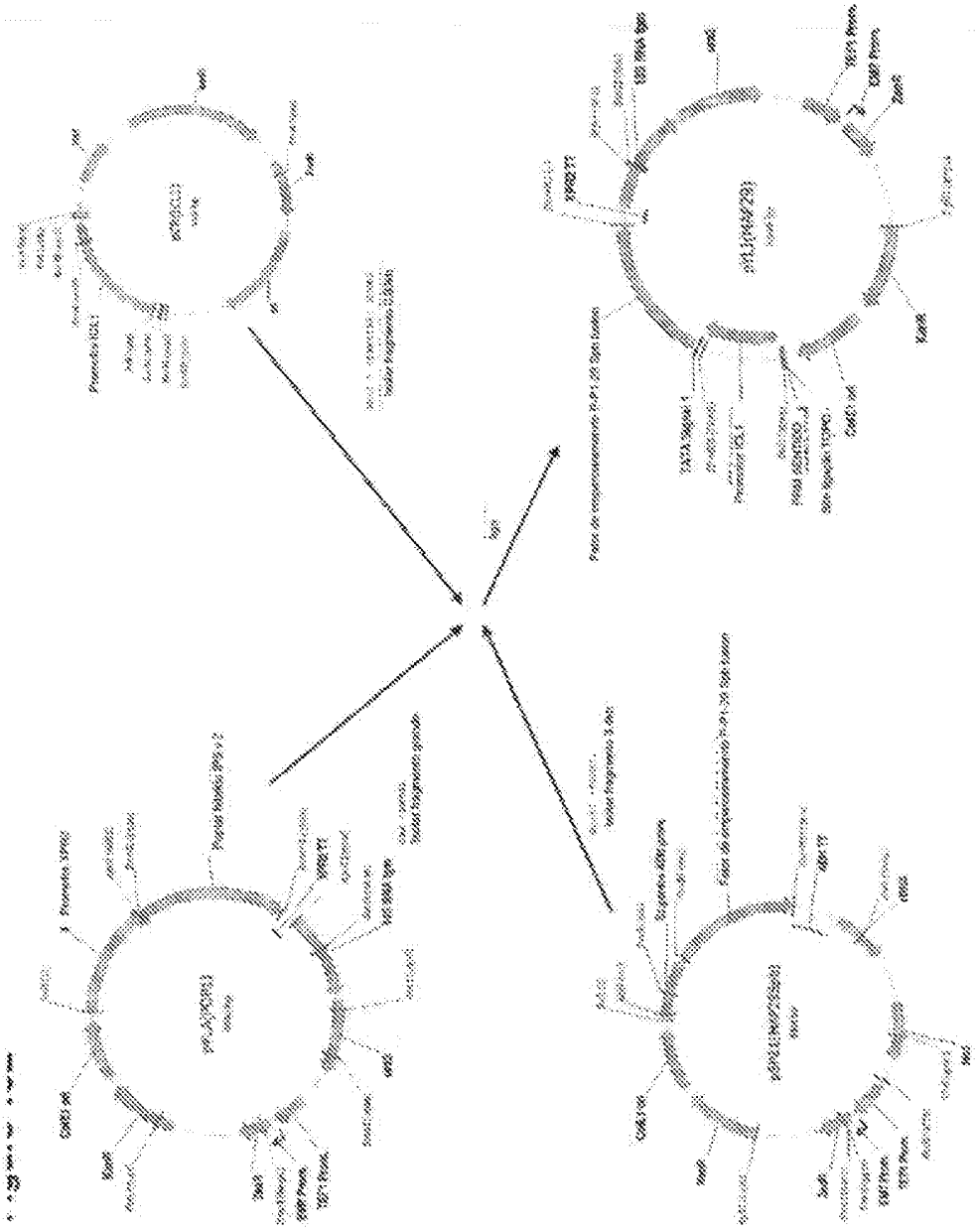


Fig. 18E

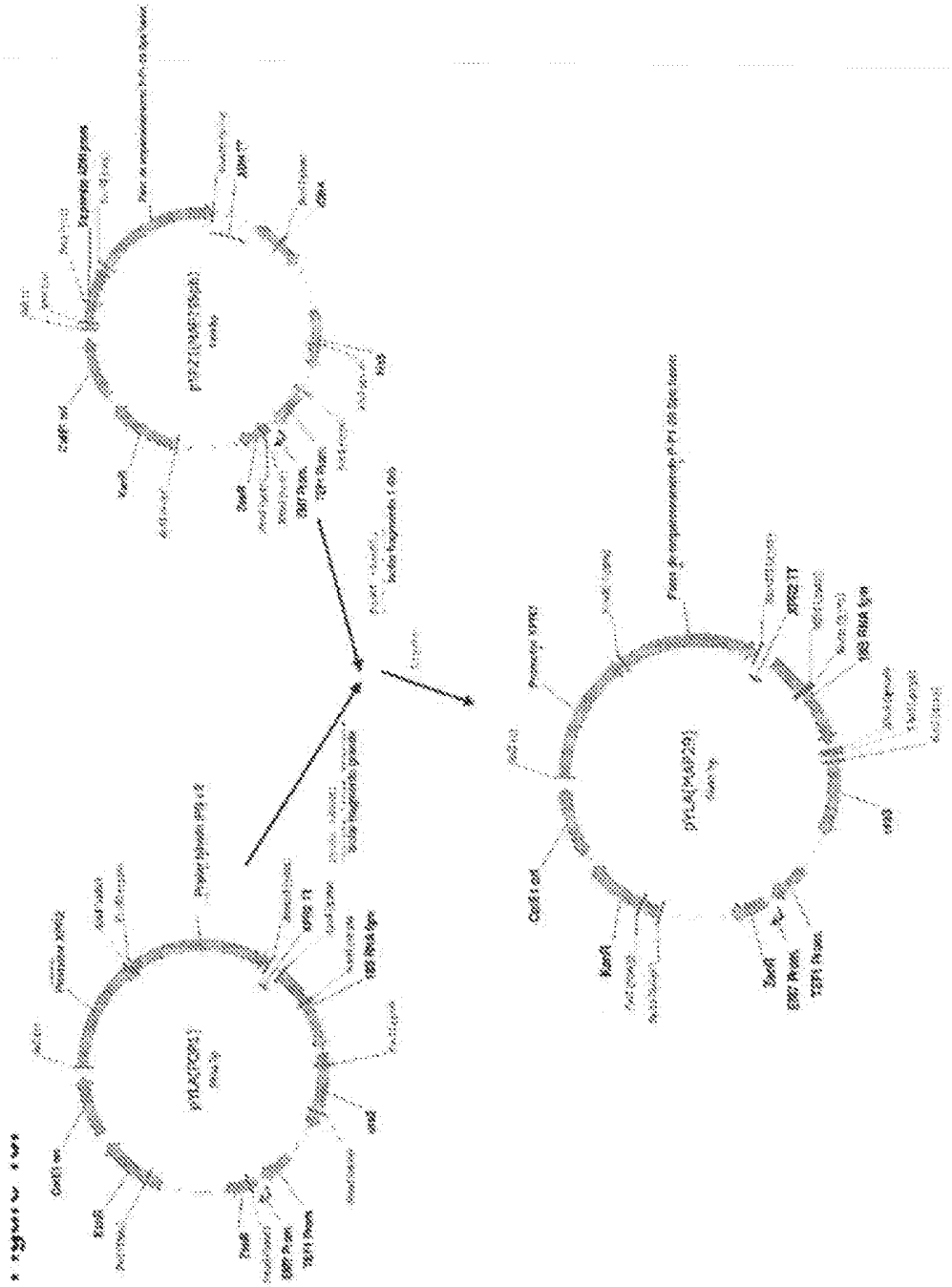


Fig. 18F

Fig. 19A

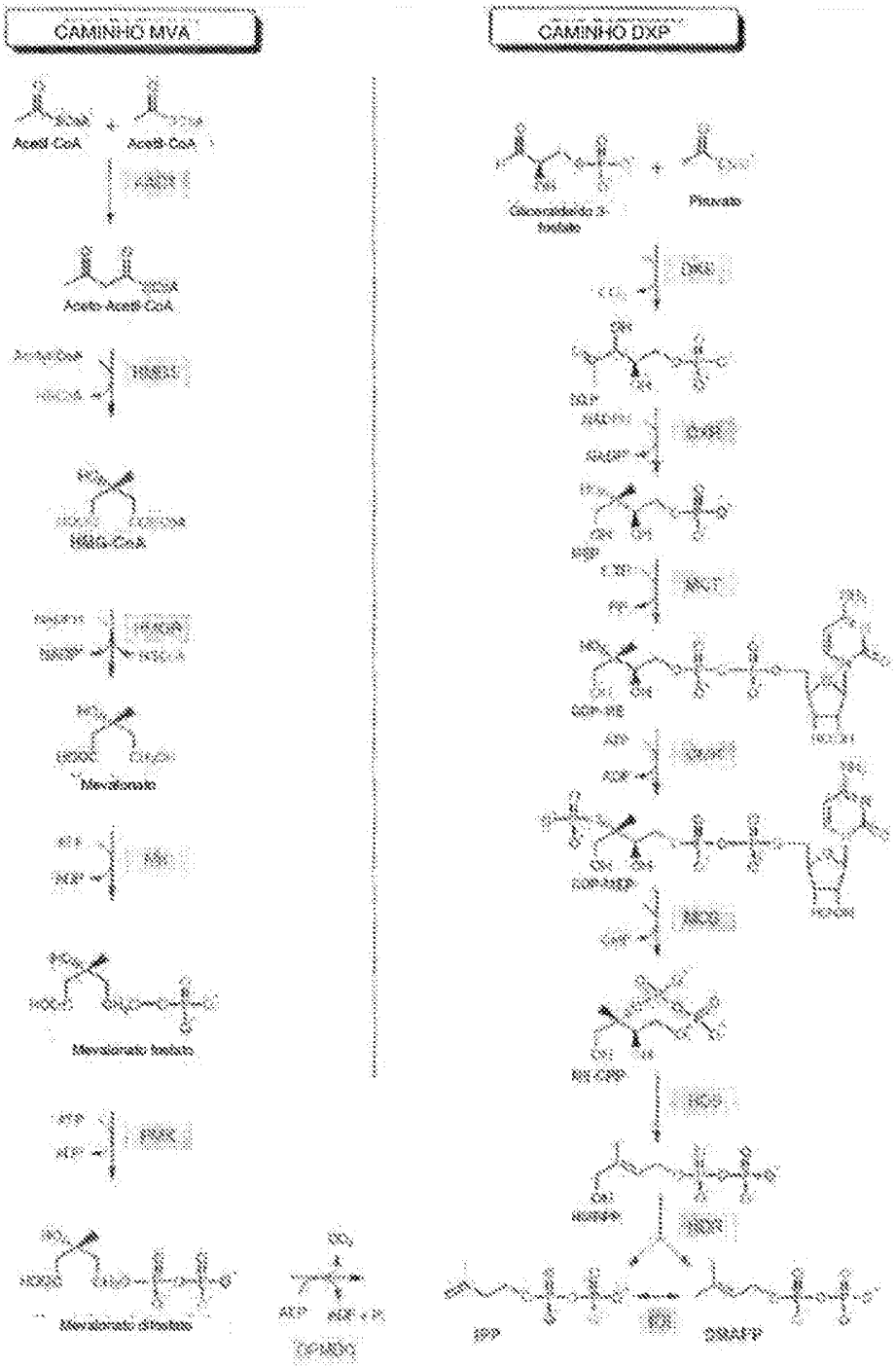

CAMINHO MVA
CAMINHO DXP
Acetil CoA
Acetil CoA
Acetoacetil CoA
Mevalonato
Mevalonato fosfato
Mevalonato difosfato
Gliceraldeído 3-fosfato
Piruvato
DXS
DXR
MCT
CMK
MCS
HDS
HDR
IPP
DMAPP

Fig. 19B

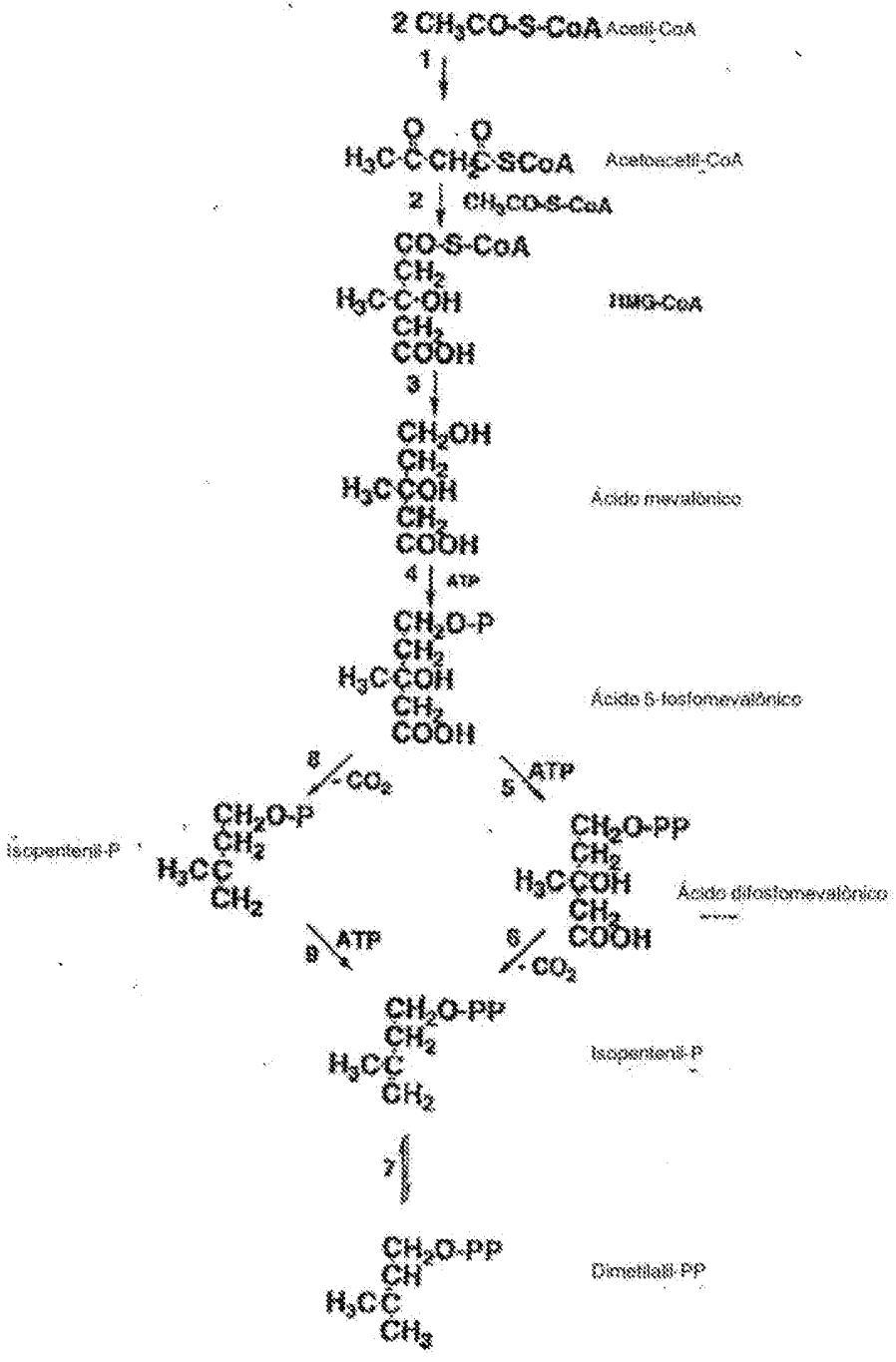

2 CH3CO-S-CoA Acetil-CoA
1
Acetoacetil-CoA
2 CH3CO-S-CoA
HMG-CoA
3
Ácido mevalónico
4 ATP
Ácido 5-fosfomevalónico
6 CO2
5 ATP
Isopentenil-P
Ácido difosfomevalónico
8 ATP
6 CO2
Isopentenil-P
7
Dimetilalil-PP

Fig. 20

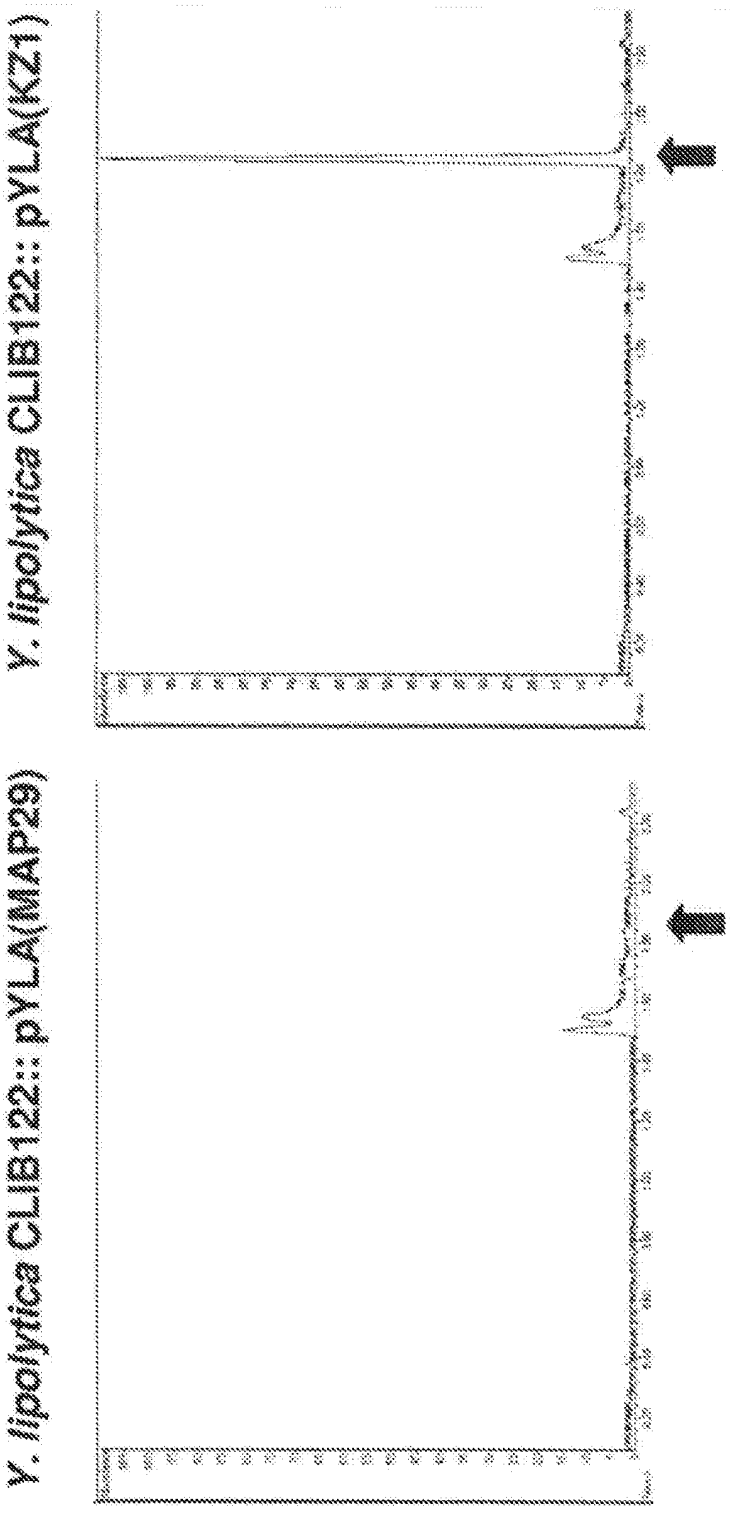

Y. lipolytica CLIB122:: pYLA(KZ1)
Y. lipolytica CLIB122:: pYLA(MAP29)

Fig. 21

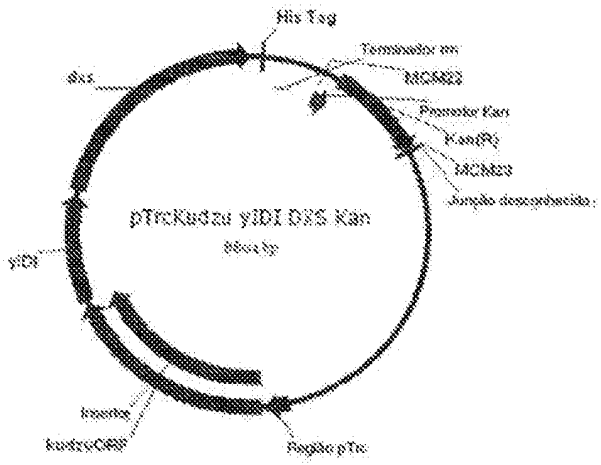


Fig. 22A

1-

gctggtaccatatgggaattcgaagctttctagaacaaaaactcatctcagaagaggatctgaatagcgccgtc
gaccatcatcatcatcatcattgagtttaaacggtctccagcttggctgttttggcggatgagagaagattttcagcc
tgatacagattaaatcagaacgcagaagcggtctgataaaacagaatttgcctggcggcagtagcgcggtggt
cccacctgaccccatgccgaactcagaagtgaaacgccgtagcgccgatggtagtgtgggtctccccatgcg
agagtagggaactgccaggcatcaaataaaacgaaaggctcagtcgaaagactgggccttttcgttttatctgtt
gtttgtcggtgaacgctctcctgagtaggacaaatccgccgggagcggatttgaacgttgcgaagcaacggcc
cggagggtggcgggcaggacgcccgccataaactgccaggcatcaaattaagcagaaggccatcctgacg
gatggccttttgcgtttctacaaactcttttgtttattttctaaatacattcaaatatgtatccgcttaacggaattgcc
agctggggcgccctctggtaaggttgggaagccctgcaaagtaaactggatggctttctcgccgccaaggatct
gatggcgcaggggatcaagctctgatcaagagacaggatgaggatcgtttcgcatgattgaacaagatggatt
gcacgcaggttctccggccgcttgggtggagaggctattcggctatgactgggcacaacagacaatcggctgct
ctgatgccgccgtgttccggctgtcagcgcaggggcgcccggttctttttgtcaagaccgacctgtccgggtgccct
gaatgaactgcaagacgaggcagcgcggctatcgtggctggccacgacgggcgttccttgcgcagctgtgctc
gacgttgtcactgaagcgggaagggactggctgctattgggcgaagtgccggggcaggatctcctgtcatctca
ccttgctcctgccgagaaagtatccatcatggctgatgcaatgcggcggctgcatacgcttgatccggctacctg
cccattcgaccaccaagcgaaacatcgcatcgagcgagcacgtactcggatggaagccggtcttgtcgatca
ggatgatctggacgaagagcatcaggggctcgcgccagccgaactgttcgccaggctcaaggcgagcatgc
ccgacggcgaggatctcgtcgtgacccatggcgatgcctgcttgccgaatatcatggtggaaaatggccgcttt
tctggattcatcgactgtggccggctgggtgtggcggaccgctatcaggacatagcgttggctacccgtgatattg
ctgaagagcttggcggcgaatgggctgaccgcttcctcgtgctttacggtatcgccgctcccgattcgcagcgca
tcgccttctatcgccttcttgacgagttcttctgacatgaccaaaatcccttaacgtgagttttcgttccactgagcgtc
agaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatcctttttttctgcgcgtaatctgctgcttgcaaacaaaaa
aaccaccgctaccagcggtggtttgtttgccggatcaagagctaccaactctttttccgaaggtaactggcttcag
cagagcgcagataccaaatactgtccttctagtgtagccgtagttaggccaccacttcaagaactctgtagcacc
gcctacatacctcgctctgctaatcctgttaccagtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttgg
actcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggtcgggctgaacgggggttcgtgcacacagcccagct
tggagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcgccacgcttcccgaa
gggagaaaggcggacaggtatccggtaagcggcagggtcggaacaggagagcgcacgagggagcttcca
gggggaaacgcctggtatctttatagtcctgtcgggtttcgccacctctgactgagcgtcgatttttgtgatgctcgt
caggggggcggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggcctttttacggttcctggccttttgctggccttttgc
tcacatgttctttcctgcgttatcccctgattctgtggataaccgtattaccgcctttgagtgagctgataccgctcgcc
gcagccgaacgaccgagcgcagcgagtcagtgagcgaggaagcggaagagcgcctgatgcggtatttctc
cttacgcatctgtgcggtatttcacaccgcatatggtgcactctcagtacaatctgctctgatgccgcatagttaagc
cagtatacactccgctatcgctacgtgactgggtcatggctgcgccccgacacccgccaacacccgctgacgc
gccctgacgggcttgtctgctcccggcatccgcttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtca
gaggttttcaccgtcatcaccgaaacgcgcgaggcagcagatcaattcgcgcgcgaaggcgaagcggcatg
catttacgttgacaccatcgaatggtgcaaaacctttcgcggtatggcatgatagcgcccggaaga

Fig. 22B

gagtcaattcagggtggtgaatgtgaaaccagtaacgttatacgatgtcgcagagtatgccggtgtctcttatc
agaccgtttcccgcgtggtgaaccaggccagccacgtttctgcgaaaacgcgggaaaaagtggaagcgg
cgatggcggagctgaattacattcccaaccgcgtggcacaacaactggcgggcaaacagtcgttgctgatt
ggcgttgccacctccagtctggccctgcacgcgccgtcgcaaattgtcgcggcgattaaatctcgcgccgat
caactgggtgccagcgtggtggtgtcgatggtagaacgaagcggcgtcgaagcctgtaaagcggcggtgc
acaatcttctcgcgcaacgcgtcagtgggctgatcattaactatccgctggatgaccaggatgccattgctgtg
gaagctgcctgcactaatgttccggcgttatttcttgatgtctctgaccagacacccatcaacagtattatttctc
ccatgaagacggtacgcgactgggcgtggagcatctggtcgcattgggtcaccagcaaatcgcgctgttag
cgggcccattaagttctgtctcggcgcgtctgcgtctggctggctggcataaatatctcactcgcaatcaaattc
agccgatagcggaacgggaaggcgactggagtgccatgtccggttttcaacaaaccatgcaaatgctgaa
tgagggcatcgttcccactgcgatgctggttgccaacgatcagatggcgctgggcgcaatgcgcgccattac
cgagtccgggctgcgcgttggtgcggatatctcggtagtgggatacgacgataccgaagacagctcatgtta
tatcccgccgtcaaccaccatcaaacaggattttcgcctgctggggcaaaccagcgtggaccgcttgctgca
actctctcagggccaggcggtgaagggcaatcagctgttgcccgtctcactggtgaaaagaaaaaccacc
ctggcgcccaatacgcaaaccgcctctccccgcgcgttggccgattcattaatgcagctggcacgacaggtt
tcccgactggaaagcgggcagtgagcgcaacgcaattaatgtgagttagcgcgaattgatctggtttgacag
cttatcatcgactgcacggtgcaccaatgcttctggcgtcaggcagccatcggaagctgtggtatggctgtgc
aggtcgtaaatcactgcataattcgtgtcgctcaaggcgcactcccgttctggataatgttttttgcgccgacatc
ataacggttctggcaaatattctgaaatgagctgttgacaattaatcatcggctcgtataatgtgtggaattgtg
agcggataacaatttcacacaggaaacagcgccgctgagaaaaagcgaagcggcactgctctttaacaat
ttatcagacaatctgtgtgggcactcgaccggaattatcgattaacttattattaaaaattaaagaggtatatatt
aatgtatcgattaaataaggaggaataaaccatgtgtgcgacctcttctcaatttactcagattaccgagcata
attcccgtcgttccgcaaactatcagccaaacctgtggaatttcgaattcctgcaatcctggagaacgacctg
aaagtggaaaagctggaggagaaagcgaccaaactggaggaagaagttcgctgcatgatcaaccgtgt
agacacccagccgctgtccctgctggagctgatcgacgatgtgcagcgcctgggtctgacctacaaaattga
aaaagacatcattaaagccctggaaaacatcgtactgctggacgaaaacaaaaagaacaaatctgacct
gcacgcaaccgctctgtcttccgtctgctgcgtcagcacggtttcgaggtttctcaggatgttttgagcgtttca
aggataaagaaggtggtttcagcggtgaactgaaaggtgacgtccaaggcctgctgagcctgtatgaagcg
tcttacctgggtttcgagggtgagaacctgctggaggaggcgctacctttccatcacccacctgaagaaca
acctgaaaagaaggcattaataccaaggttgcagaacaagtgagccacgccctggaactgccatatcacca
gcgtctgcaccgtctggaggcacgttggttcctggataaatacgaacgaaagaaccgcatcaccagctgc
tgctggagctggcgaagctggatttaacatggtacagaccctgcaccagaaagagctgcaagatctgtccc
gctggtggaccgagatgggcctggctagcaaactggatttgtacgcgaccgcctgatggaagtttatttctgg
gcactgggtatggcgccagacccgcagtttggtgaatgtcgcaaagctgttactaaaatgtttggtctggtgac
gatcatcgatgacgtgtatgacgtttatggcactctggacgaactgcaactgttcaccgatgctgtagagcgct
gggacgttaacgctattaacaccctgccggactatatgaaactgtgtttcctggcactgtacaacaccgttaac
gacacgtcctattctattctgaaagagaaaggtcataacaacctgtcctatctgacgaaaagctggcgtgaa
ctgtgcaaagcctttctgcaagaggcgaaatggtccaacaacaaaattatcccggcttttctccaagtacctgg
aaaacgccagcgtttcctcctcggtgtagcgctgctggcgccgtcttactttccgta

Fig. 22C


tgccagcagcaggaagacatctccgaccacgcgctgcgttccctgaccgacttccatggtctggtgcgttctag
ctgcgttatcttccgcctgtgcaacgatctggccacctctgcggcggagctggaacgtggcgagactaccaatt
ctatcattagctacatgcacgaaaacgatggtaccagcgaggaacaggcccgcgaagaactgcgtaaactg
atcgacgccgaatggaaaaagatgaatcgtgaacgcgttagcgactccacctgctgcctaaagcgttcatg
gaaatcgcagttaacatggcacgtgtttcccactgcacctaccagtatggcgatggtctgggtcgcccagacta
cgcgactgaaaaccgcatcaaactgctgctgattgacccttcccgattaaccagctgatgtatgtctaactgca
tcgcccttaggaggtaaaaaaaaaatgactgccgacaacaatagtatgccccatggtgcagtatctagttacgc
caaattagtgcaaaaccaaacacctgaagacatttggaagagtttcctgaaattattccattacaacaaagac
ctaataccgatctagtgagacgtcaaatgacgaaagcggagaaacatgttttctggtcatgatgaggagca
aattaagttaatgaatgaaaattgtattgttttggattgggacgataatgctattggtgccggtaccaagaaagttt
gtcatttaatggaaaatattgaaaagggtttactacatcgtgcattctccgtctttatttttcaatgaacaaggtgaatt
acttttacaacaaagagccactgaaaaaataacttccctgatcttggactaacacatgctgctctcatccacta
tgtattgatgacgaattaggtttgaagggtaagctagacgataagattaagggcgctattactgcggcggtgag
aaaactagatcatgaattaggtattccagaagatgaaactaagacaagggtaagtttcacttttaaacagaa
tccattacatggcaccaagcaatgaaccatgggtgaacatgaaattgattacatcctatttttataagatcaacg
ctaaagaaaacttgactgtcaacccaaacgtcaatgaagttagagacttcaaatgggtttcaccaaatgatttg
aaaactatgtttgctgacccaagttacaagtttacgccttggtttaagattatttgcgagaattacttattcaactggt
gggagcaattagatgaccttctgaagtggaaaatgacaggcaaattcatagaatgctataacaacgcgtcct
gcattcgccccttaggaggtaaaaaaaacatgagttttgatattgccaaatacccgacgctggcactggtcgactc
cacccaggagttacgactgttgccgaaagagagtttaccgaaactctgcgacgaactgcgccgctatttactc
gacagcgtgagccgttccagcgggcacttcgcctccgggctgggcacggtcgaactgacgtggcgctgca
ctatgtctacaacacccccgtttgaccaattgatttgggatgtggggcatcaggcttatccgcataaaatttttgacc
ggacgccgcgacaaaatcggcaccatccgtcagaaaggcggtctgcacccgttcccgtggcgcggcgaaa
gcgaatatgacgtattaagcgtcgggcattcatcaacctccatcagtgccggaattggtattgcggttgctgccg
aaaaagaaggcaaaaatcgccgcaccgtctgtgtcattggcgatggcgcgattaccgcaggcatggcgtttg
aagcgatgaatcacgcgggcgatatccgtcctgatatgctggtgattctcaacgacaatgaaatgtcgatttcc
gaaaatgtcggcgcgctcaacaaccatctggcacagctgcttccggtaagcttactctcactgcgcgaagg
cgggaaaaaagtttttctctggcgtgccgccaattaaagagctgctcaaacgcaccgaagaacatattaaagg
catggtagtgcctggcacgttgtttgaagagctgggcttaactacatcggcccggtggacggtcacgatgtgct
ggggcttatcaccacgctaaagaacatgcgcgacctgaaaggcccgcagttcctgcatatcatgaccaaaa
aagggtcgtggttatgaaccggcagaaaaagacccgatcacttccacgccgtgcctaaatttgatccctccag
cggttgtttgccgaaaagtagcggcggttgccgagctattcaaaaatctttggcgactggttgtgcgaaacggc
agcgaaagacaacaagctgatggcgattactcggcgatgcgtgaaggttcggcatggtcgagttttcacgt
aaattcccggatcgctacttcgacgtggcaattgccgagcaacacgcggtgaccttgctgcgggtctggcgat
tggtgggtacaaacccattgtcgcgatttactccacttcctgcaacgcgcctatgatcaggtgctgcatgacgtg
gcgatcaaaagcttccggtcctgttcgccatcgaccgcgcgggcattgttggtgctgacggtcaaacccatca
gggtgcttttgatctctcttacctgcgctgcataccggaaatggtcatatgacccgagcgatgaaaacgaatg
tcgccagatgctctataccggctatcactataacgatggcccgtcagcggtgcgctacccgcgtggcaacgcg
gtcgg

Fig. 22D

cgtggaactgacgccgctggaaaaactaccaattggcaaaggcattgtgaagcgtcgtggcgagaaactgg
cgatccttaactttggtacgctgatgccagaagcggcgaaagtcgccgaatcgctgaacgccacgctggtcg
atatgcgtttttgtgaaaccgcttgatgaagcgttaattctggaaatggccgccagccatgaagcgctggtcacc
gtagaagaaaacgccattatgggcggcgcaggcagcggcgtgaacgaagtgctgatggcccatcgtaaaac
cagtacccgtgctgaacattggcctgccggacttctttattccgcaaggaactcaggaagaaatgcgcgccga
actcggcctcgatgccgctggtatggaagccaaaatcaaggcctggctggcataactgca

(SEQ ID NO:20)

Fig. 23A

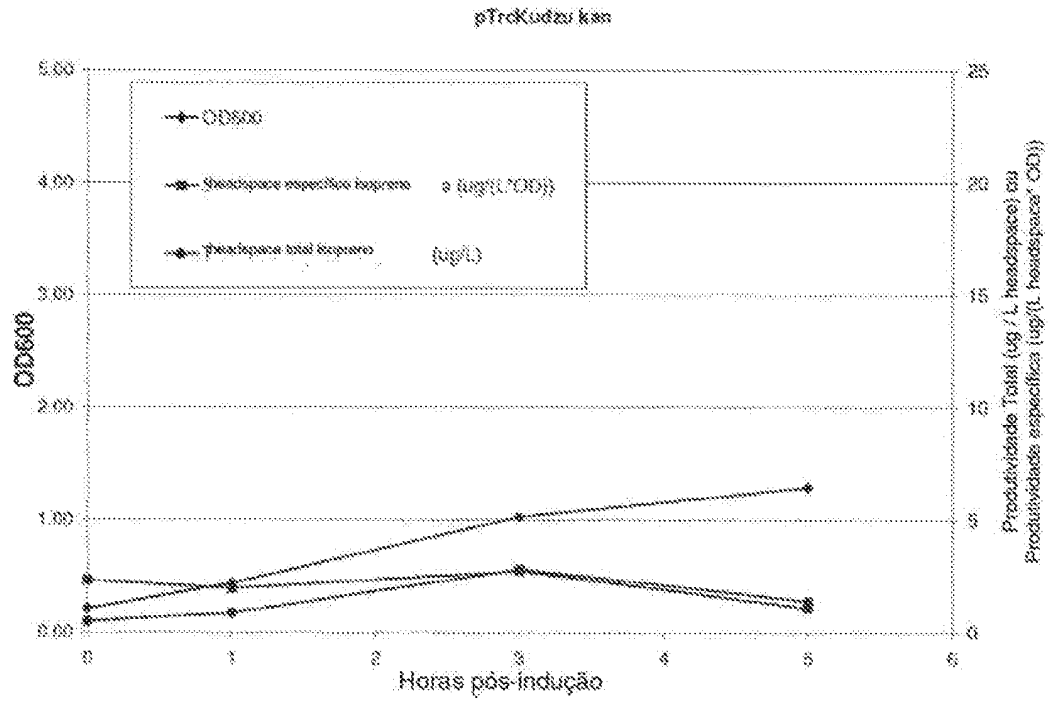

pTrcKudzu kan
OD600
Horas pós-indução
Produtividade Total (ug / L headspace) ou
Produtividade específica (ug/(L headspace* OD))

Fig. 23B

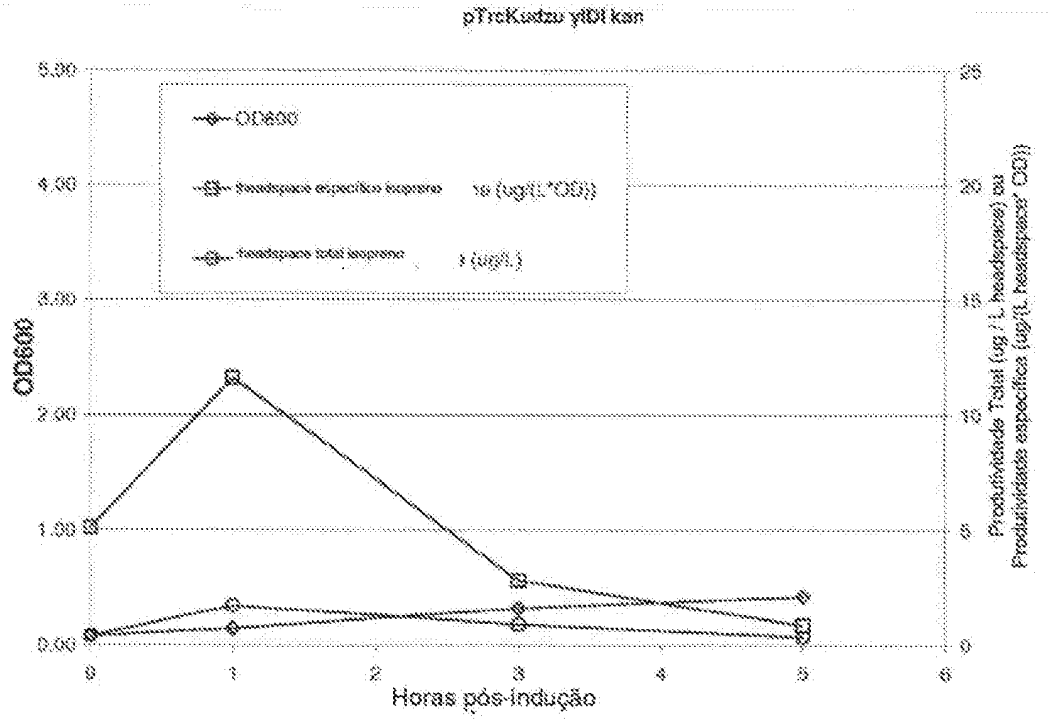

pTrcKudzu ydiI kan
OD600
Produtividade específica isopreno
Produtividade total isopreno
OD600
Produtividade Total (ug / L headspace) ou
Produtividade específica (ug/L headspace/ OD))
Horas pós-indução

Fig. 23C

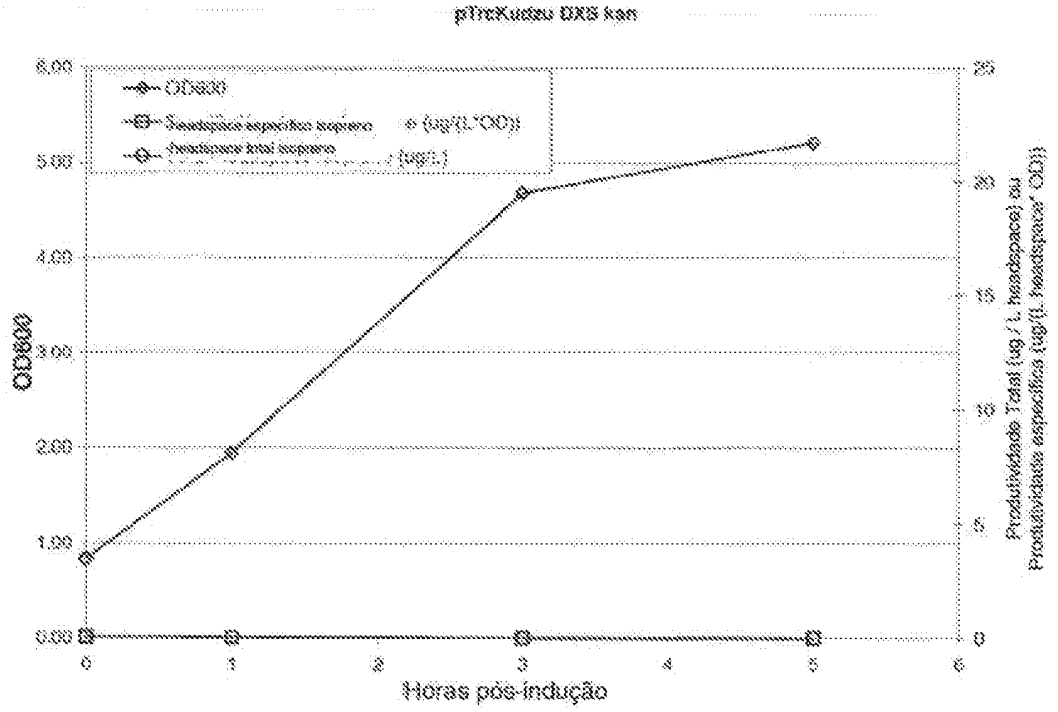

pTrcKudzu DXS kan
OD600
Produtividade específica máximo
(ug/(L*OD))
Produtividade total máximo
(ug/L)
OD600
Produtividade Total (ug / L headspace) ou
Produtividade específica (ug/(L headspace* OD))
Horas pós-indução
0
1
2
3
4
5
6
0.00
1.00
2.00
3.00
4.00
5.00
6.00
0
5
10
15
20
25

Fig. 23D

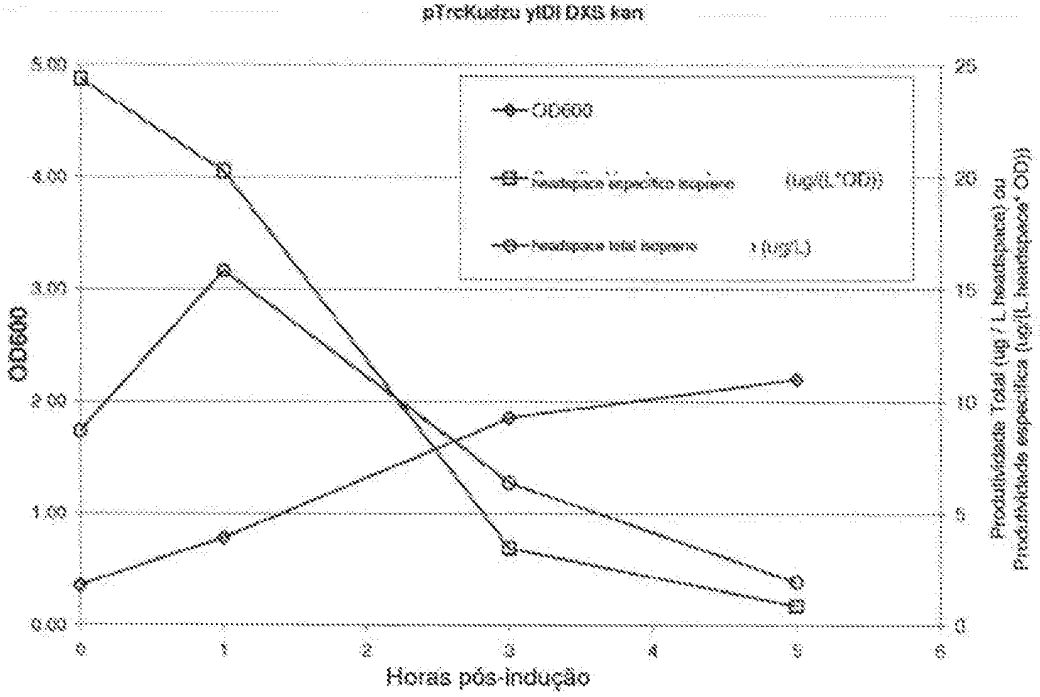

pTrcKudzu yIDI DXS kan
OD600
Horas pós-indução
Produtividade Total (mg / L headspace) ou
Produtividade específica (mg/L headspace * OD))

Fig. 23E

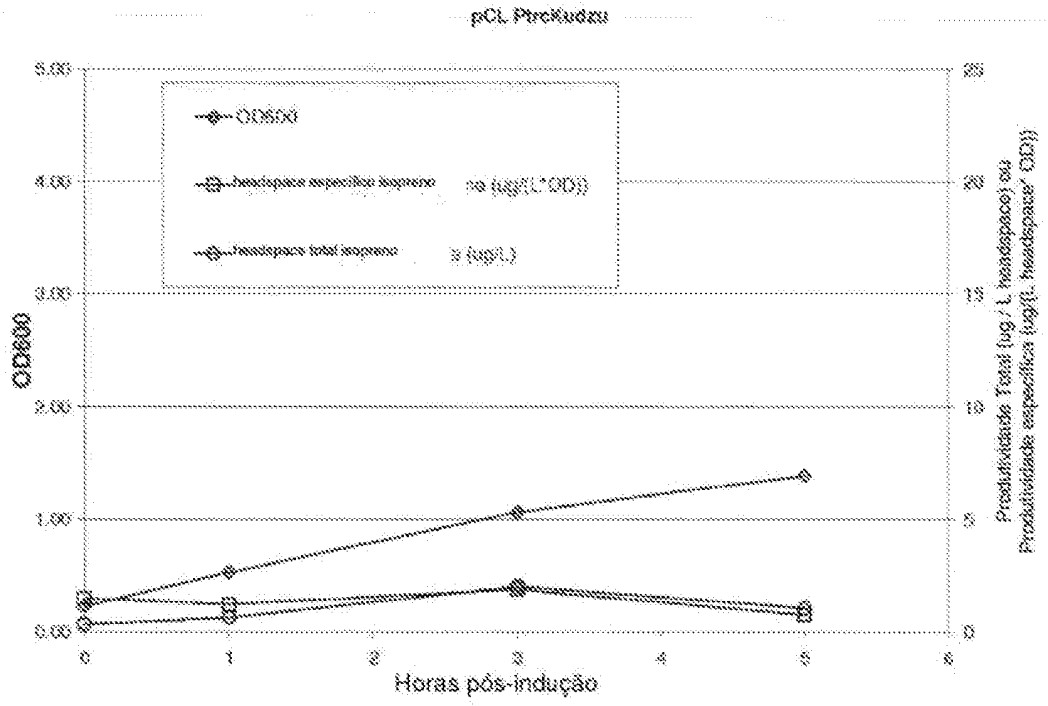

pCL PtrKudzu
OD600
Horas pós-indução
Produtividade Total (ug / L headspace) ou
Produtividade específica (ug/(L headspace* OD))

Fig. 23F

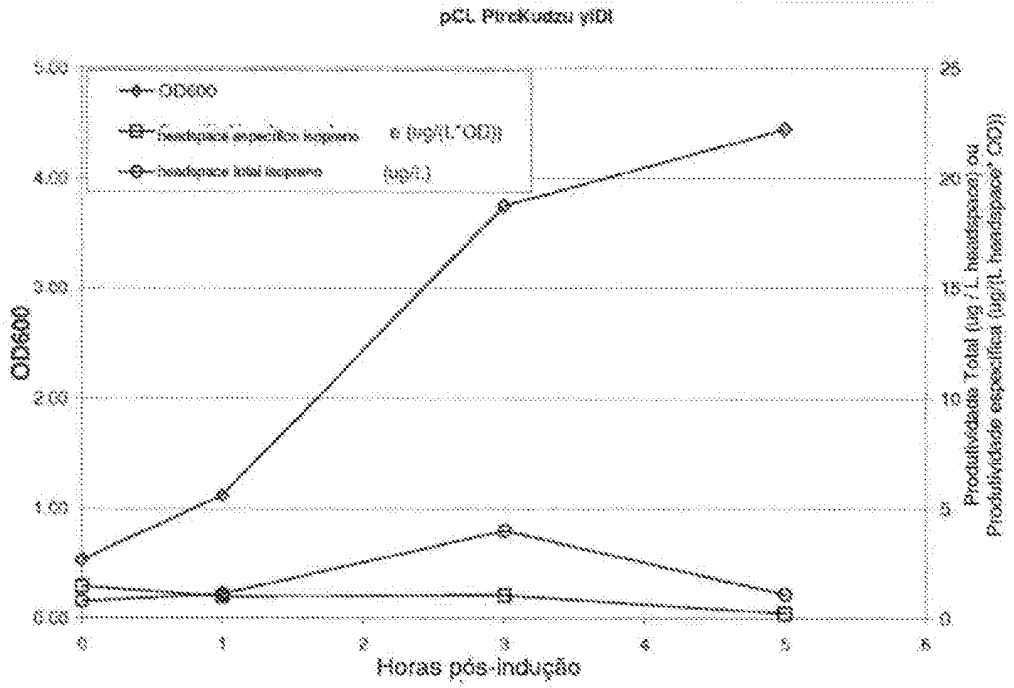

pCL PtrcKudzu ylDI
OD600
Produtividade específica isopreno e (ug/L*OD))
Headspace total isopreno (ug/L)
OD600
Produtividade Total (ug / L headspace) ou
Produtividade específica (ug/L headspace* OD))
Horas pós-indução

Fig. 23G

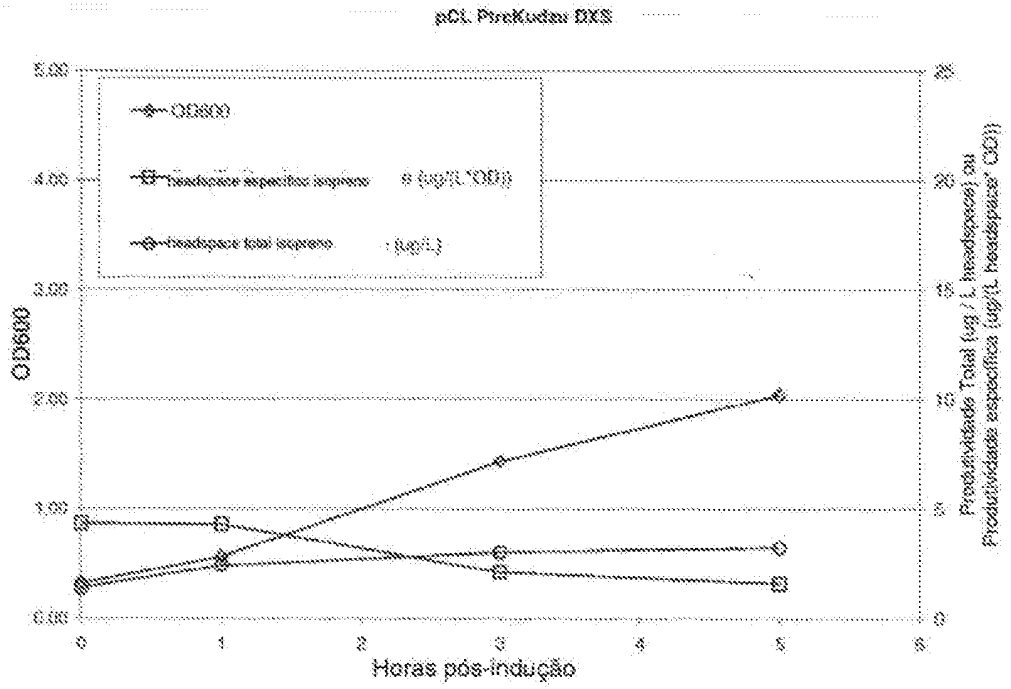

pCL PreKudzu DXS
OD600
Produtividade Total (ug / L headspace) ou
Produtividade específica (ug/(L headspace* OD))
Horas pós-indução
0
1
2
3
4
5
6

Fig. 23H

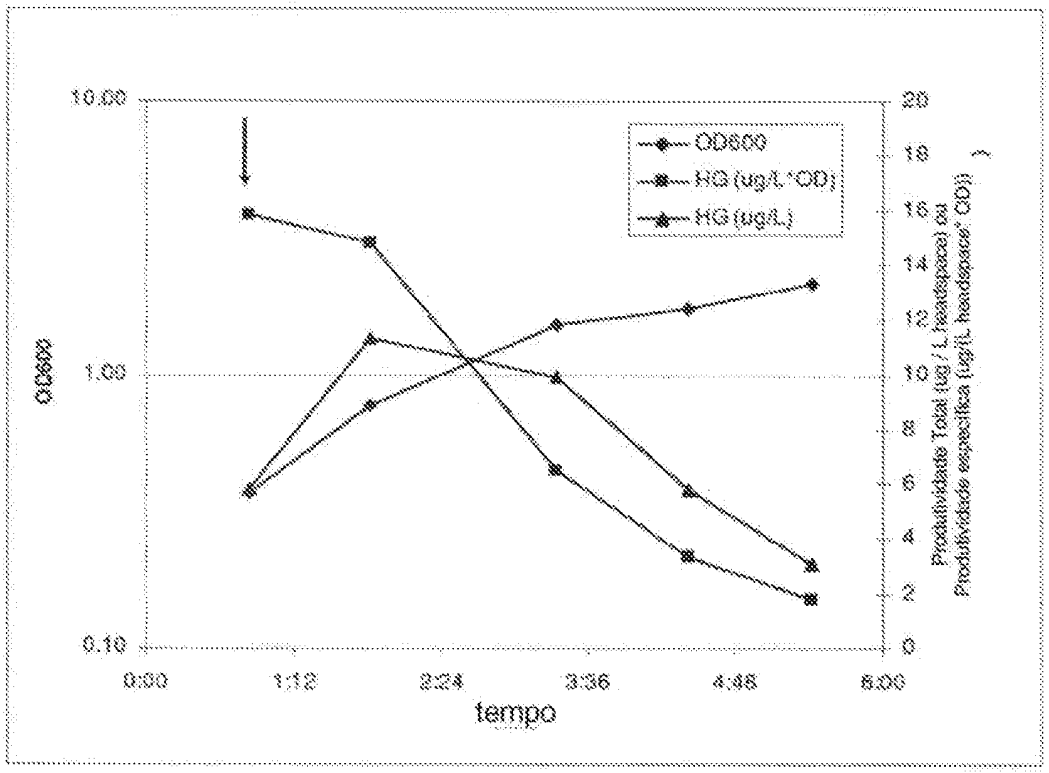

10.00
1.00
0.10
OD600
0:00
1:12
2:24
3:36
4:48
6:00
tempo
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
OD600
HG (ug/L*OD)
HG (ug/L)
Produtividade Total (ug / L headspace) ou
Produtividade especifica (ug/L headspace* OD))

Fig. 24

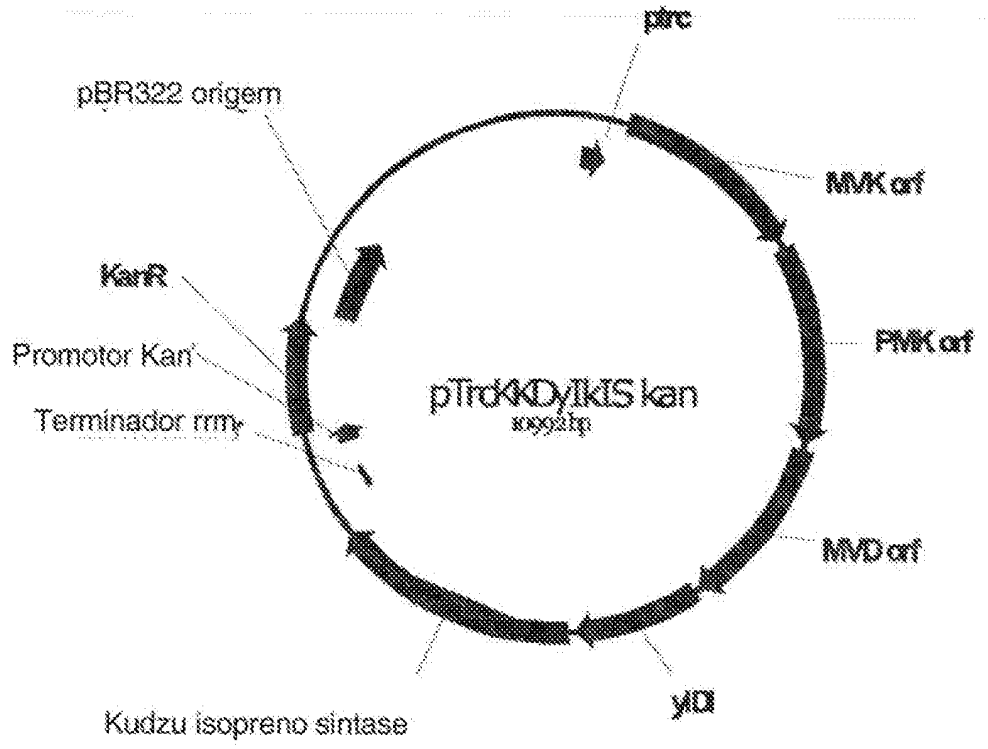

ptrc
pBR322 origem
MVK orf
KanR
PMK orf
Promotor Kan
pTrcKKDyIkIS kan
Terminador rrnB
MVD orf
yIDI
Kudzu isopreno sintase

Fig. 25A

5'-
gtttgacagcttatcatcgactgcacggtgcaccaatgcttctggcgtcaggcagccatcggaagctgtggtatg
gctgtgcaggtcgtaaatcactgcataattcgtgtcgctccaaggcgcactcccgttctggataatgttttttgcgcc
gacatcataacggttctggcaaatattctgaaatgagctgttgacaattaatcatccggctcgtataatgtgtgga
attgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagcgccgctgagaaaaagcgaagcggcactgctctttta
acaatttatcagacaatctgtgtgggcactcgaccggaattatcgattaacttattattaaaaattaaagaggtat
atattaatgtatcgattaaataaggaggaataaaccatggatccgagctcggatccactagtaacggccgcca
gtgtgctggaattcgcccttaggaggtaaaaaaacatgtcattaccgttcttaacttcgcaccgggaaaggttat
tatttttggtgaacactctgctgtgtacaacaagcctgccgtcgctgctagtgtgtctgcgttgagaacctaccgct
aataagcgagtcatctgcaccagatactattgaattggacttcccggacattagcttttaatcataagtggtccatc
aatgattttcaatgccatcaccgaggatcaagtaaactcccaaaaattggccaaggctcaacaagccaccgat
ggcttgtctcaggaactcgttagtcttttggatccgttgttagctcaactatccgaatccttccactaccatgcagcg
tttgtttcctgtatatgtttgtttgcctatgccccccatgccaagaatattaagttttcttaaagtctactttacccatcgg
tgctgggttgggctcaagcgcctctatttctgtatcactggccttagctatggcctacttgggggggttaataggat
ctaatgacttggaaaagctgtcagaaaacgataagcatatagtgaatcaatgggccttcatagggtgaaaagtg
tattcacggtacccctttcaggaatagataacgctgtggccacttatggtaatgccctgctatttgaaaaagactc
acataaatggaacaataaacacaaacaatttaagttcttagatgatttcccagccattccaatgatcctaacctat
actagaattccaaggtctacaaaagatcttgttgctcgcgttcgtgtgttggtcaccgagaaatttcctgaagttat
gaagccaattctagatgccatgggtgaatgtgccctacaaggcttagagatcatgactaagttaagtaaatgta
aaggcaccgatgacgaggctgtagaaactaataatgaactgtatgaacaactattggaattgataagaataa
atcatggactgcttgtctcaatcggtgtttctcatcctggattagaacttattaaaaatctgagcgatgatttgagaa
ttggctccacaaaacttaccggtgctggtggcggcggttgctcttgactttgttacgaagagacattactcaaga
gcaaattgacagcttcaaaaagaaattgcaagatgatttagttacgagacatttgaaacagactgggtggga
ctggctgctgtttgttaagcgcaaaaaatttgaataaagatcttaaaatcaaatccctagtattccaattatttgaa
aataaaactaccacaaagcaacaaattgacgatctattattgccaggaaacacgaatttaccatggacttcat
aagctaatttgcgataggcctgcacccttaaggaggaaaaaaacatgtcagagttgagagccttcagtgccc
cagggaaagcgttactagctggtggatatttagtttagatacaaaatatgaagcatttgtagtcggattatcggc
aagaatgcatgctgtagcccatccttacggttcattgcaagggtctgataagtttgaaggtcgtgtgaaaagtaa
acaatttaaagatggggagtggctgtaccatataagtcctaaaagtggcttcattcctgtttcgataggcggatct
aagaaccctttcattgaaaaagttatcgctaacgtatttagctacttttaaacctaacatggacgactactgcaata
gaaacttgttcgttattgatattttctctgatgatgcctaccattctcaggaggatagcgttaccgaacatcgtggca
acagaagattgagtttcattcgcacagaattgaagaagttcccaaaacagggctgggctcctcggcaggttta
gtcacagttttaactacagctttggcctcctttttttgtatcggacctggaaaataatgtagacaaatatagagaagt
tattcataatttagcacaagttgctcattgtcaagctcagggtaaaattggaagcgggtttgatgtagcggcggc
agcatatggatctatcagatatagaagattcccacccgcattaatctctaatttgccagatattggaagtgctactt
acggcagtaaactggcgcatttggttgatgaagaagactggaatattacgattaaaagtaaccatttaccttcg
ggattaactttatggatgggcgatattaagaatggttcagaaacagtaaaactggtccagaaggtaaaaaaatt
ggtatgattcgcatatgccagaaagcttgaaaata

Fig. 25B

tatacagaactcgatcatgcaaattctagatttatggatggactatctaaactagatcgcttacacgagactc
atgacgattacagcgatcagatatttgagtctcttgagaggaatgactgtacctgtcaaaagtatcctgaaat
cacagaagttagagatgcagttgccacaattagacgttccttagaaaaataactaaagaatctggtgccg
atatcgaacctcccgtacaaactagcttattggatgattgccagaccttaaaaggagttcttacttgcttaatac
ctggtgctggtggttatgacgccattgcagtgattactaagcaagatgttgatcttagggctcaaaccgctaat
gacaaaagatttctaaggttcaatggctggatgtaactcaggctgactggggtgttaggaaagaaaaaga
tccggaaacttatcttgataaataacttaaggtagctgcatgcagaattcgcccttaaggaggaaaaaaaa
atgaccgtttacacagcatccgttaccgcaccgtcaacatcgcaacccttaagtattgggggaaaaggg
acacgaagttgaatctgcccaccaattcgtccatatcagtgacttatcgcaagatgacctcagaacgttga
cctctgcggctactgcacctgagttgaacgcgacacttgtggttaaatggagaaccacacagcatcgac
aatgaaagaactcaaaattgtctgcgcgacctacgccaattaagaaaggaaatggaatcgaaggacgc
ctcattgcccacattatctcaatggaaactccacattgtctccgaaaataacttcctacagcagctggttag
cttcctccgctgctggcttgctgcattggtctctgcaattgctaagttataccaattaccacagtcaacttcaga
aatatctagaatagcaagaaaggggtctggttcagcttgtagatcgttgtttggcggatacgtggcctggga
aatgggaaaagctgaagatggtcatgattccatggcagtacaaatcgcagacagctctgacttggcctcag
atgaaagcttgtgtcctagttgtcagcgatattaaaaaggatgtgagttccactcagggtatgcaattgaccgt
ggcaacctccgaactatttaaagaaagaattgaacatgtcgtaccaaagagatttgaagtcatgcgtaaag
ccattgttgaaaaagatttcgccaccttgcaaaggaaacaatgatggatccaactctttccatgccacatgt
ttggacictttcccttccaatattctacatgaatgacacttccaagcgtatcatcagttggtgccacaccattaat
cagtttacggagaaacaatcgtgcatacacgttgatgcaggtccaaatgctgtgttgtactacttagctga
aaatgagtcgaaactctttgcattiatctataaattgttiggctctgttcctggatgggacaagaaatttactact
gagcagcttgaggcttcaaccatcaattgaatcatctaactttactgcacgtgaattggatcttgagttgcaa
aaggatgttgccagagtgattttaactcaagtcggttcaggcccacaagaaacaaacgaatcttgattgac
gcaaagactggtctaccaaaggaataagatcaattcgctgcatcgccctaggaggtaaaaaaaaaatga
ctgccgacaacaatagtatgccccatggtgcagtatctagttacgccaaattagtgcaaaaccaaacacct
gaagacatttttggaagagtttcctgaaattattccattacaacaaagacctaatacccgatctagtgagacgt
caaatgacgaaagcggagaaacatgttttttctggtcatgatgaggagcaaattaagttaatgaatgaaaatt
gtattgttttggattgggacgataatgctattggtgccggtaccaagaaagttgtcatttaatggaaaatattga
aaagggtttactacatcgtgcattctccgtctttatttttcaatgaacaaggtgaattactttttacaacaaagagc
cactgaaaaaaataacttttccctgatcttttggactaacacatgctgctctcatccactatgtattgatgacgaatt
aggtttgaagggtaagctagacgataagattaagggcgctattacigcggcggtgagaaaaactagatcat
gaattaggtattccagaagatgaaactaagacaagggtaagtttcacttttaaacagaatccattacatg
gcaccaagcaatgaaccatggggtgaacatgaaattgattacatcctatttttataagatcaacgctaaaga
aaacttgactgtcaacccaaacgtcaatgaagttagagacttcaaatgggtttcaccaaatgatttgaaaac
tatgtttgctgacccaagttacaagttiacgccttggtttaagattatttgcgagaattacttattcaacigglggg
agcaattagatgaccttctgaagtggaaaatgacaggcaaattcatagaatgctataacaacgcgtcctg
cattcgccttaggaggtaaaaaaacatgtgtgcgacctcttctcaatttactcagattaccgagcataattcc
cgtcgttccgcaaactatcagccaaacctgtggaatttcgaattcctgcaatcoctggagaacgacctgaa
agtggaaaagctggaggagaaagcgaccaaactggaggaagaagttcgctgcatg

Fig. 25C

atcaaccgtgtagacacccagccgctgtccctgctggagctgatcgacgatgtgcagcgcctgggtctgacc
tacaaattgaaaaagacatcattaaagccctggaaaacatcgtactgctggacgaaaacaaaaagaaaca
aatctgacctgcacgcaaccgctctgtctttccgtctgctgcgtcagcacggtttcgaggtttctcaggatgttttt
gagcgtttcaaggataaagaaggtggtttcagcggtgaactgaaaggtgacgtccaaggcctgctgagcct
gtatgaagcgtcttacctgggtttcgagggtgagaacctgctggaggaggcgcgtacctttccatcacccac
ctgaagaacaacctgaaagaaggcattaataccaaggttgcagaacaagtgagccacgccctggaactg
ccatatcaccagcgtctgcaccgtctggaggcacgttggttcctggataaatacgaaccgaaagaaccgca
tcaccagctgctgctggagctggcgaagctggatttaacatggtacagaccctgcaccagaaagagctgc
aagatctgtcccgctggtggaccgagatgggcctggctagcaaactggatttttgtacgcgaccgcctgatgg
aagtttatttctgggcactgggtatggcgccagacccgcagttggtgaatgtcgcaaagctgttactaaaatgt
ttggtctggtgacgatcatcgatgacgtgtatgacgtttatggcactctggacgaactgcaactgttcaccgatg
ctgtagagcgctgggacgttaacgctattaacaccctgccggactatatgaaactgtgtttcctggcactgtac
aacaccgttaacgacacgtcctattctattctgaaagagaaaggtcataacaacctgtcctatctgacgaaaa
gctggcgtgaactgtgcaaagcctttctgcaagaggcgaaatggtccaacaacaaaattatcccggctttctc
caagtacctggaaaacgccagcgttcctcctccggtgtagcgctgctggcgccgtcttactttccgtatgcca
gcagcaggaagacatctccgaccacgcgctgcgttccctgaccgacttccatggtctggtgcgttctagctgc
gttatcttccgcctgtgcaacgatctggccacctctgcggcggagctggaacgtggcgagactaccaatttcta
tcattagctacatgcacgaaaacgatggtaccagcgaggaacaggcccgcgaagaactgcgtaaactgat
cgacgccgaatggaaaaagatgaatctgtgaacgcgttagcgactccaccctgctgcctaaagcgttcatgg
aaatcgcagttaacatggcacgtgtttcccactgcacctaccagtatggcgatggtctgggtcgcccagacta
cgcgactgaaaaccgcatcaaactgctgctgattgacccttcccgattaaccagctgatgtatgtctaactgc
agctggtaccatatgggaattcgaagctttctagaacaaaaactcatctcagaagaggatctgaatagcgcc
gtcgaccatcatcatcatcatcattgagtttaaacggtctccagcttggctgttttggcggatgagagaagatttt
cagcctgatacagattaaatcagaacgcagaagcggtctgataaaacagaatttgcctggcggcagtagc
gcggtggtcccacctgaccccatgccgaactcagaagtgaaacgccgtagcgccgatggtagtgtggggt
ctccccatgcgagagtagggaactgccaggcatcaaataaaacgaaaggctcagtcgaaagactgggcc
tttcgttttatctgttgtttgtcggtgaacgctctcctgagtaggacaaatccgccgggagcggatttgaacgttgc
gaagcaacggcccggagggtggcgggcaggacgcccgccataaactgccaggcatcaaattaagcag
aaggccatcctgacggatggcctttttgcgtttctacaaactctttttgtttatttttctaaatacattcaaatatgtatc
cgcttaaccggaattgccagctggggcgccctctggtaaggttgggaagccctgcaaagtaaactggatgg
ctttctcgccgccaaggatctgatggcgcaggggatcaagctctgatcaagagacaggatgaggatcgtttc
gcatgattgaacaagatggattgcacgcaggttctccggccgcttgggtggagaggctattcggctatgactg
ggcacaacagacaatcggctgctctgatgccgccgtgttccggctgtcagcgcaggggcgcccggttctttt
gtcaagaccgacctgtccggtgccctgaatgaactgcaagacgaggcagcgcggctatcgtggctggcca
cgacgggcgttccttgcgcagctgtgctcgacgttgtcactgaagcgggaagggactggctgctattgggcg
aagtgccggggcaggatctcctgtcatctcaccttgctcctgccgagaaagtatccatcatggctgatgcaat
gcggcggctgcatacgcttgatccggctacctgcccattcgaccaccaagcgaaacatcgcatcgagcga
gcacgtactcggatggaagccggtcttgtcgatcaggatgatctggacgaagagcatcaggggctcgcgcc
agccgaactgttcgccaggctcaaggcgagcatgcccgacggcgaggatctcgtcgtgacccat

Fig. 25D

ggcgatgcctgcttgccgaatatcatggtggaaaatggccgcttttctggattcatcgactgtggccggctgggtgt
ggcggaccgctatcaggacatagcgttggctacccgtgatattgctgaagagcttggcggcgaatgggctgac
cgcttcctcgtgctttacggtatcgccgctcccgattcgcagcgcatcgccttctatcgccttcttgacgagttcttctg
acgcatgaccaaaatcccttaacgtgagttttcgttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggat
cttcttgagatcctttttttctgcgcgtaatctgctgcttgcaaacaaaaaaaccaccgctaccagcggtggtttgttt
gccggatcaagagctaccaactctttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaaatactgtcct
tctagtgtagccgtagttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgctctgctaatcctgt
taccagtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttggactcaagacgatagttaccggataagg
cgcagcggtcgggctgaacgggggttcgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacctacaccgaactg
agatacctacagcgtgagctatgagaaagcgccacgcttcccgaagggagaaaggcggacaggtatccggt
aagcggcagggtcggaacaggagagcgcacgagggagcttccagggggaaacgcctggtatctttatagtc
ctgtcgggtttcgccacctctgacttgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcaggggggcggagcctatggaaaaa
cgccagcaacgcggcctttttacggttcctggccttttgctggccttttgctcacatgttctttcctgcgttatcccctgat
tctgtggataaccgtattaccgcctttgagtgagctgataccgctcgccgcagccgaacgaccgagcgcagcg
agtcagtgagcgaggaagcggaagagcgcctgatgcggtatttctccttacgcatctgtgcggtatttcacacc
gcatatggtgcactctcagtacaatctgctctgatgccgcatagttaagccagtatacactccgctatcgctacgtg
actgggtcatggctgcgccccgacacccgccaacacccgctgacgcgccctgacgggcttgtctgctcccggc
atccgcttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcagaggttttcaccgtcatcaccgaaacg
cgcgaggcagcagatcaattcgcgcgcgaaggcgaagcggcatgcatttacgttgacaccatcgaatggtgc
aaaacctttcgcggtatggcatgatagcgcccggaagagagtcaattcagggtggtgaatgtgaaaccagtaa
cgttatacgatgtcgcagagtatgccggtgtctcttatcagaccgtttcccgcgtggtgaaccaggccagccacgt
ttctgcgaaaacgcgggaaaaagtggaagcggcgatggcggagctgaattacattcccaaccgcgtggcac
aacaactggcgggcaaacagtcgttgctgattggcgttgccacctccagtctggccctgcacgcgccgtcgcaa
attgtcgcggcgattaaatctcgcgccgatcaactgggtgccagcgtggtggtgtcgatggtagaacgaagcgg
cgtcgaagcctgtaaagcggcggtgcacaatcttctcgcgcaacgcgtcagtgggctgatcattaactatccgct
ggatgaccaggatgccattgctgtggaagctgcctgcactaatgttccggcgttatttcttgatgtctctgaccaga
cacccatcaacagtattatttctcccatgaagacggtacgcgactgggcgtggagcatctggtcgcattgggtca
ccagcaaatcgcgctgttagcgggcccattaagttctgtctcggcgcgtctgcgtctggctggctggcataaatat
ctcactcgcaatcaaattcagccgatagcggaacgggaaggcgactggagtgccatgtccggtttttcaacaaa
ccatgcaaatgctgaatgagggcatcgttcccactgcgatgctggttgccaacgatcagatggcgctgggcgca
atgcgcgccattaccgagtccgggctgcgcgttggtgcggatatctcggtagtgggatacgacgataccgaag
acagctcatgttatatcccgccgtcaaccaccatcaaacaggattttcgcctgctggggcaaaccagcgtggac
cgcttgctgcaactctctcagggccaggcggtgaagggcaatcagctgttgcccgtctcactggtgaaaagaaa
aaccaccctggcgcccaatacgcaaaccgcctctccccgcgcgttggccgattcattaatgcagctggcacga
caggtttcccgactggaaagcgggcagtgagcgcaacgcaattaatgtgagttagcgcgaattgatctg

(SEQ ID NO:33)

Fig. 26

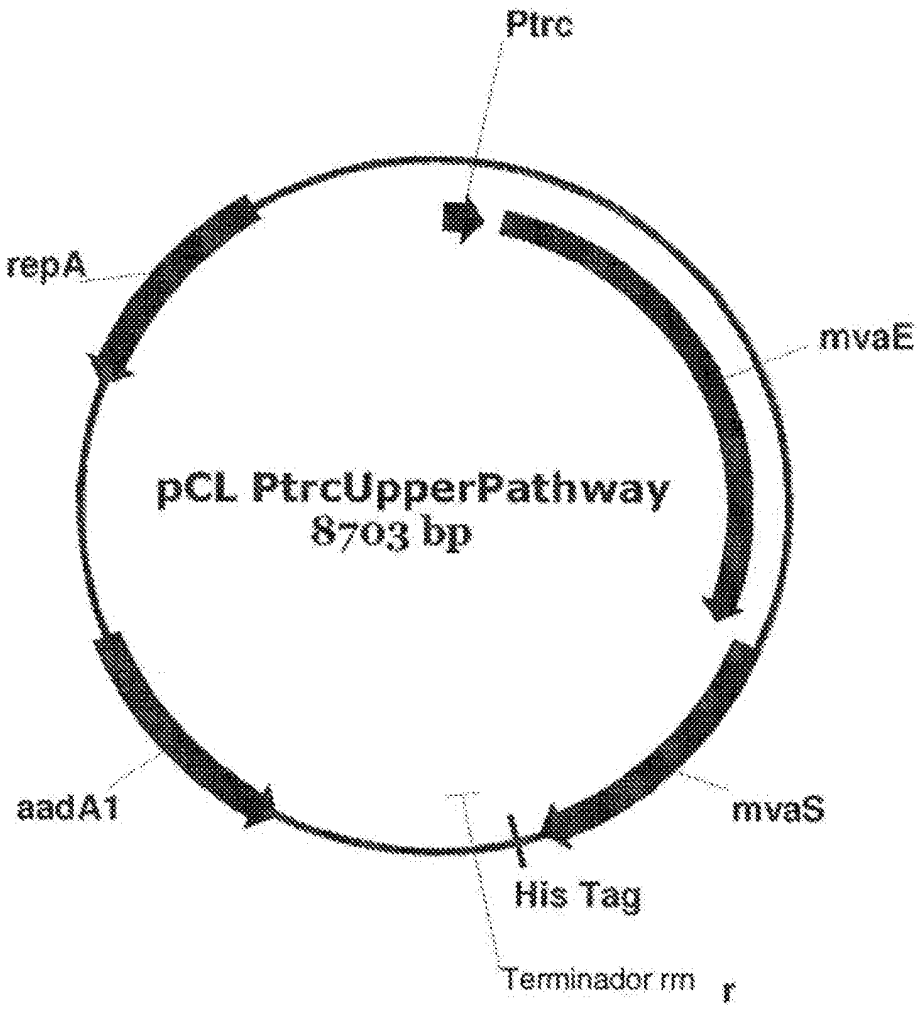

Ptrc
repA
mvaE
pCL PtrcUpperPathway
8703 bp
aadA1
mvaS
His Tag
Terminador rrn

Fig. 27A

5'-

cccgtcttactgtcgggaattcgcgttggccgattcattaatgcagattctgaaatgagcigttgacaattaatcatc
cggctcgtataatgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagcgccgctgagaaaaagcg
aagcggcactgctcttaacaatttatcagacaatctgtgtgggcactcgaccggaattatcgattaacttattatta
aaaattaaagaggtatatattaatgtatcgattaaataaggaggaataaaccatggatccgagctcaggaggta
aaaaaacatgaaaacagtagttattatgatgcattacgaacaccaattggaaaatataaaggcagcttaagtc
aagtaagtgccgtagacttaggaacacatgttacaacacaacttttaaaaagacattccactatttctgaagaaa
ttgatcaagtaatcttiggaaatgtttacaagctggaaatggccaaaatccgcacgacaaatagcaataaac
agcggtttgtctcatgaaattcccgcaatgacggttaatgaggtctgcggatcaggaatgaaggccgttatttgg
cgaaacaattgattcaattaggagaagcggaagttttaattgctggcgggattgagaaatatgtcccaagcaccta
aattacaacgtttttaattacgaaacagaaagctacgatgcgccttttctagtatgatgtatgatggattaacggatg
cctttagtggtcaggcaatgggcttaactgctgaaaatgtggccgaaaagtatcatgtaactagagaagagcaa
gatcaatttctgtacattcacaattaaaagcagctcaagcacaagcagaagggatattcgctgacgaaatagc
cccattagaagtatcaggaacgcttgtggagaaagatgaagggattcgccctaattcgagcgttgagaagcta
ggaacgcttaaaacagttttttaaagaagacggtactgtaacagcagggaatgcatcaaccattaatgatgggg
cttctgcttgattattgcttcacaagaaatatgccgaagcacacggtcttccttatttagctattattcgagacagtgtg
gaagtcggtattgatccagcctatatgggaatttcgccgattaaagccattcaaaaactgttagcgcgcaatcaa
cttactacggaagaaattgatctgtatgaaatcaacgaagcattgcagcaacttcaatcgtggtccaaagaga
actggctttaccagaggaaaaggtcaacatttatgggtggcggtatttcattaggtcatgcgattggtgccacaggt
gctcgtttattaacgagtttaagttatcaattaaatcaaaaagaaaagaaatatggagtggcttcttatgtatcggc
ggtggcttaggactcgctatgctactagagagacctcagcaaaaaaaaaacagccgatttttatcaaatgagtcc
tgaggaacgcctggctctcttcttaatgaaggccagattctgctgatacaaaaaaagaaattgaaaatacggct
ttatcttcgcagattgccaatcatatgattgaaaatcaaatcagtgaaacagaagtgccgatgggcgttggcttac
atttaacagtggacgaaactgattatttggtaccaatggcgacagaagagccctcagttattgcggcttgagtaa
tggtgcaaaaatagcacaaggatttaaaacagtgaatcaacaacgcttaatgcgtggacaaatcgttttttacga
tgttgcagatccgagtcattgattgataaactacaagtaagagaagcggaagttttcaacaagcagagttaag
ttatccatctatcgttaaacggggcggcggcttaagagattgcaatatcgtacttttgatgaatcattgtatctgtcg
actttttagtagatgttaaggatgcaatgggggcaaatatcgttaacgctatgtggaaggtgtggccgagttgttcc
gtgaatggtttgcggagcaaaagatttttattcagtatttaagtaattatgccacggagtcggttgttacgatgaaaa
cggctattccagttcacgtttaagtaaggggagcaatggccgggaaattgctgaaaaaattgttttagcttcacg
ctatgcttcattagatccttatcgggcagtcacgcataacaaaggaatcatgaatggcattgaagctgtagttttag
ctacaggaaatgatacacgcgctgttagcgcttcttgtcatgcttttgcggtgaaggaaggtcgctaccaaggctt
gactagttggacgctggatggcgaacaactaattggtgaaatttcagttccgcttgctttagccacggttggcggtg
ccacaaaagtcttacctaaatctcaagcagctgctgatttgttagcagtgacggatgcaaaagaactaagtcga
gtagtagcggctgttggtttggcacaaaatttagcggcgttacgggccttagtctctgaaggaattcaaaaagga
cacatggctctacaagcacgttcttttagcgatgacggtcggagctactggtaaagaagttgaggcagtcgctca
acaattaaaacgtcaaaaaacgatgaaccaagaccgagccatggctatttttaaatgatttaagaaaacaataa
aggaggtaaaaaaaacatgacaattgggat

Fig. 27B

tgataaaattagttttttgtgccccctattatattgatatgacggcactggctgaagccagaaatgtagaccctgg
aaaatttcatattggtattgggcaagaccaaatggcggtgaaccccaatcagccaagatattgtgacatttgcagc
caatgccgcagaagcgatcttgaccaaagaagataaagaggccattgatatggtgattgtcgggactgagtcc
agtatcgatgagtcaaaagcggccgcagttgtcttacatcgtttaatggggattcaaccttcgctcgctctttcgaa
atcaaggaagcttgttacggagcaacagcaggcttacagttagctaagaatcacgtagccttacatccagataa
aaaagtctggtcgtagcggcagatattgcaaaatatggcttaaatctggcggtgagcctacacaaggagctg
gggcggttgcaatgttagttgctagtgaaccgcgcatttggctttaaaagaggataatgtgatgctgacgcaaga
tatctatgacttttggcgtccaacaggccacccgtatcctatggtcgatggtccttgtcaaacgaaacctacatcc
aatcttttgcccaagtctgggatgaacataaaaaaacgaaccggtcttgatttgcagattatgatgcttagcgttcc
atattccttacacaaaaatgggcaaaaaagccttattagcaaaaatctccgaccaaactgaagcagaaacagg
aacgaatttagccgttatgaagaaagtatcgtctatagtcgtcgcgtaggaaacttgtatacgggttcacttttatc
tgggactcatttccctttagaaaatgcaacgactttaaccgcaggcaatcaaattggtttattcagttatggttctgg
tgctgtcgctgaatttttcactggtgaattagtagctggttatcaaaatcatttacaaaaagaaactcatttagcactg
ctggataatcggacagaactttctatcgctgaatatgaagccatgtttgcagaaactttagacacagacattgatc
aaacgttagaagatgaattaaaatatagtatttctgctattaataataccgttcgttcttatcgaaactaagagatctg
cagctggtaccatatgggaattcgaagcttgggcccgaacaaaaactcatctcagaagaggatctgaatagcg
ccgtcgaccatcatcatcatcatcattgagtttaaacggtctccagcttggctgttttggcggatgagagaagatttt
cagcctgatacagattaaatcagaacgcagaagcggtctgataaaacagaatttgcctggcggcagtagcgc
ggtggtcccacctgaccccatgccgaactcagaagtgaaacgccgtagcgccgatggtagtgtggggtctccc
catgcgagagtagggaactgccaggcatcaaataaaacgaaaggctcagtcgaaagactgggccttcgtttt
atctgttgtttgtcggtgaacgctctcctgagtaggacaaatccgccgggagcggatttgaacgttgcgaagcaa
cggcccggagggtggcgggcaggacgcccgccataaactgccaggcatcaaattaagcagaaggccatcc
tgacggatggcctttttgcgtttctacaaactctttttgtttatttttctaaatacattcaaatatgtatccgctcatgagac
aataaccctgataaatgcttcaataatctggcgtaatagcgaagaggcccgcaccgatcgcccttcccaacagt
tgcgcagcctgaatggcgaatggcgcctgatgcggtattttctccttacgcatctgtgcggtatttcacaccgcatat
ggtgcactctcagtacaatctgctctgatgccgcatagttaagccagccccgacacccgccaacacccgctga
cgagcttagtaaagccctcgctagattttaatgcggatgttgcgattacttcgccaactattgcgataacaagaaa
aagccagcctttcatgatatatctcccaatttgtgtagggcttattatgcacgcttaaaaataataaaagcagacttg
acctgatagtttggctgtgagcaattatgtgcttagtgcatctaacgcttgagttaagccgcgccgcgaagcggcg
tcggcttgaacgaattgttagacattatttgccgactaccttggtgatctcgcctttcacgtagtggacaaattcttcc
aactgatctgcgcgcgaggccaagcgatcttcttcttgtccaagataagcctgtctagcttcaagtatgacgggct
gatactgggccggcaggcgctccattgcccagtcggcagcgacatccttcggcgcgatttgccggttactgcgc
tgtaccaaatgcgggacaacgtaagcactacatttcgctcatcgccagcccagtcgggcggcgagttccatag
cgttaaggtttcatttagcgcctcaaatagatcctgttcaggaaccggatcaaagagttcctccgccgctggacct
accaaggcaacgctatgttctcttgcttttgtcagcaagatagccagatcaatgtcgatcgtggctggctcgaaga
taccigcaagaatgtcattgcgctgccattctccaaattgcagttcgcgcttagctggataacgccacggaatgat
gtcgtcgtgcacaacaatggtgacttctacagcgcggagaatctcgtctctccagggaagccgaagtttcca
aaaggtcgttgat

Fig. 27C

caaagctcgccgcgttgtttcatcaagccttacggtcaccgtaaccagcaaatcaatatcactgtgtggcttca
ggccgccatccactgcggagccgtacaaatgtacggccagcaacgtcggttcgagatggcgctcgatgac
gccaactacctctgatagttgagtcgatacttcggcgatcaccgcttccctcatgatgtttaacttgtttagggc
gactgccctgctgcgtaacatcgttgctgctccataacatcaaacatcgacccacggcgtaacgcgcttgctg
cttggatgcccgaggcatagactgtaccccaaaaaaacagtcataacaagccatgaaaaccgccactgc
gccgttaccaccgctgcgttcggtcaaggttctggaccagttgcgtgagcgcatacgctacttgcattacagct
tacgaaccgaacaggcttatgtccactgggttcgtgccttcatccgtttccacggtgtgcgtcacccggcaacc
ttgggcagcagcgaagtcgaggcatttctgtcctggctggcgaacgagcgcaaggtttcggtctccacgcat
cgtcaggcattggcggccttgctgttcttctacggcaaggtgctgtgcacggatctgccctggcttcaggagat
cggaagacctcggccgtcgcggcgcttgccggtggtgctgaccccggatgaagtggttcgcatcctcggtttt
ctggaaggcgagcatcgtttgttcgcccagcttctgtatggaacgggcatgcggatcagtgagggtttgcaac
tgcgggtcaaggatctggatttcgatcacggcacgatcatcgtgcgggagggcaagggctccaaggatcg
ggccttgatgttacccgagagcttggcacccagcctgcgcgagcagggggaattaatttcccacgggttttgctg
cccgcaaacgggctgttctggtggttggctagtttgttatcagaatcgcagatccggcttcagccggtttgccggct
gaaagcgctatttcttccagaattgccatgattttttccccacgggaggcgtcactggctccgtgtgtcggca
gctttgattcgataagcagcatcgcctgtttcaggctgtctatgtgtgactgttgagctgtaacaagttgtctcagg
tgttcaatttcatgttctagttgctttgttttactggtttcaccgttcttattaggtgttacatgctgttcatctgttacattgt
cgatctgttcatggtgaacagctttgaatgcaccaaaaactcgtaaaagctctgatgtatctatcttttttacacc
gttttcatctgtgcatatggacagtttcccttgatatgtaacggtgaacagttgttctacttttgtttgttagtcttgat
gcttcactgatagatacaagagccataagaacctcagatccttccgtatttagccagtatgttctctagtgtggtt
cgttgttttgcgtgagccatgagaacgaaccattgagatcatacttactttgcatgtcactcaaaaattttgcctc
aaaactggtgagctgaatttttgcagttaaagcatcgtgtagtgttttttcttagtccgttatgtaggtaggaaatctga
tgtaatggttgttggtattttgtcaccattcattttttatctggttgtttctcaagttcggttacgagatccatttgtctatcta
gttcaacttggaaaatcaacgtatcagtcgggcggcctcgcttatcaaccaccaatttcatattgctgtaagtgtt
taaatctttacttattggtttcaaaacccattggttaagccttttaaactcatggtagttatttttcaagcattaacatg
aacttaaattcatcaaggctaatctctatatttgccttgtgagttttcttttgtgttagtcttttaataaccactcataaa
tcctcatagagtatttgtttttcaaaagacttaacatgttccagattatattttatgaatttttttaactggaaaagataa
ggcaatatctcttcactaaaaactaatttctaatttttcgcttgagaacttggcatagtttgtccactggaaaatctc
aaagccttaaccaaaggattcctgatttccacagttctcgtcatcagctctctggttgctttagctaatacaccat
aagcatttttccctactgatgttcatcatctgagcgtattggttataagtgaacgataccgtccgttctttccttgtag
ggttttcaatcgtggggttgagtagtgccacacagcataaaattagcttggtttcatgctccgttaagtcatagcg
actaatcgctagttcatttgctttgaaaacaactaattcagacatacatctcaattggtctaggtgattttaatcact
ataccaattgagatgggctagtcaatgataattactagtccttttccttgagttgtgggtatctgtaaattctgcta
gaccttgctggaaaacttgtaaattctgctagaccctctgtaaattccgctagacctttgtgtgttttttttgtttatatt
caagtggttataatttatagaataaagaaagcaataaaaaaaagataaaaagaatagatcccagccctgtgtat
aactcactacttagtcagttccgcagtattacaaaaggatgtcgcaaacgctgtttgctcctctacaaaacag
accttaaaaccctaaaggcttaagtagcaccctcgcaagctcgggcaaatcgctgaatattccttttgtctccg
acc

Fig. 27D

Atcaggcacctgagtcgctgtcttttcgtgacattcagttcgctgcgctcacggctctggcagtgaatggggtaaat
ggcactacaggcgccttttatggattcatgcaaggaaactacccataatacaagaaaagcccgtcacgggcttctc
agggcgttttatggcgggtctgctatgtggtgctatctgactttttgctgttcagcagttcctgccctctgattttccagtctg
accacttcggattatcccgtgacaggtcattcagactggctaatgcacccagtaaggcagcggtatcatcaacagg
ctta

(SEQ ID NO:46)

Fig. 28

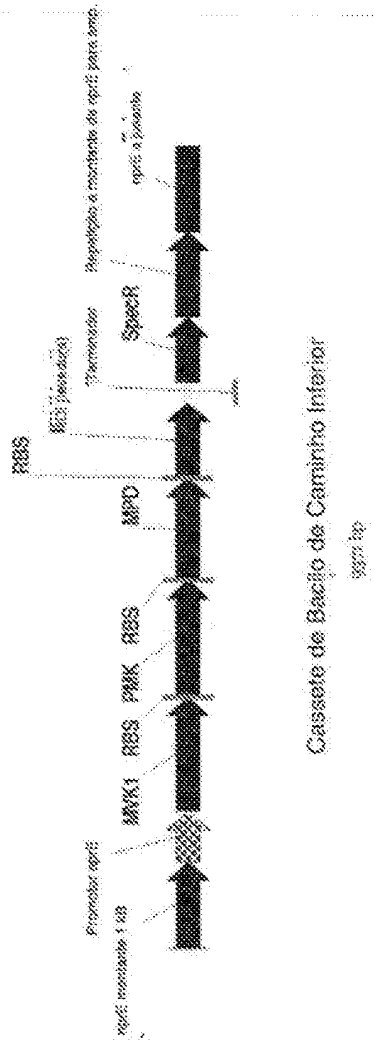

RBS
MVD
RBS
PMK
RBS
MVK1
SpecR
Cassete de Bacilo de Caminho Inferior

Fig. 29A

5'-
igtaaccttgcttcaaatgagtagaaataatgcacatccatgttgtatcgtgcaaataaagtgtttcatccgtagga
aaaaatgacttagtatctgttccgctttttctgatgaaatgtgctcccgacaaaattgaatgaatcatggacatttgc
tggcttgatacagcgaaagcagccgttcctatgttatatatcggatttaacagcaggacaaaaaacaccatgaca
gccatcgtcacccacttattcacacgcacataaaccttcctgacttttggaacagatgatagctcatcaaaaatcc
cgccattgccaaataaatcgtatatggcattactgcaccataatcttttgagatttgatttgggatatggcgcaagcag
caagacaagcagtccgataatcagcgtataaaataagcctagtaagatcttatccgttctccaatacagcttgaaa
aacactacattcaacgcaatgggaagagtgatgatgaaaaaacagaaacacgaatgcaatcggctccatcccat
ccgggtattccttccaatacgaaaagaaactaaaaaatcatttgtacgatcggcaaactgacaacagcaaggtcg
aacgtataaaacttacccttccgccatgatcacgcggcatcagcatatagtgaaaagccgtcagcagcacatat
ccgtataacaaaaaatgcagcagcggcagcagttcttttccgtcctctcttaagtaagcgctggtgaagtttgttgatt
gcacctggtgaataagttcaacagacactcccgccagcagcacaatccgcaatataacacccgccaagaacat
tgtgcgctgccggtttatttgggatgatgcaccaaaagatataagcccgccagaacaacaattgaccattgaatc
agcagggtgcttgtctgcttaatataaaataacgttcgaaatgcaatacataatgactgaataactccaacacga
acaacaactccatttctttctgctatcaaaataacagactcgtgatttccaaacgagctttcaaaaaagcctctgcc
ccttgcaaatcggatgcctgtctataaaattcccgatattggttaaacagcggcgcaatggcggccgcatctgatgt
ctttgcttggcgaatgttcatcttatttcttcctcccttctcaataatttttttcatttctatccctttttctgtaaagtttatttttcagaa
tacttttatcatcatgcttgaaaaaaatatcacgataatatccattgttctcacggaagcacacgcaggtcatttgaac
gaatttttcgacaggaatttgccgggactcaggagcatttaacctaaaaaaagcatgacatttcagcataatgaac
atttactcatgtctatttcgttcttttctgtatgaaaatagttatttcgagtcttctacggaaatagcgagagatgatatacc
taaatagagataaaatcatctcaaaaaaaatgggtctactaaaatattatccatctattacaataaattcacagaata
gtcttttaagtaagtctactctgaatttttttaaaaggagagggtaaagagtgtcattacgttcttaacttctgcaccgg
gaaaggttattatttttggtgaacactctgctgtgtacaacaagcctgccgtcgctgctagtgtgtctgcgttgagaac
ctacctgctaataagcgagtcatctgcaccagatactattgaattggacttcccggacattagcttttaatcataagtg
gtccatcaatgatttcaatgccatcaccgaggatcaagtaaactcccaaaaattggccaaggctcaacaagcca
ccgatggcttgtctcaggaactcgttagtcttttggatccgttgttagctcaactatccgaatccttccactaccatgca
gcgttttgtttcctgtatatgtttgtttgcctatgccccatgccaagaatattaagtttctttaaagtctacttttaccccatcg
gtgctgggttgggctcaagcgcctctatttctgtatcactggccttagctatggcctactgggggggttaatagtgatct
aatgacttggaaaagctgtcagaaaacgataagcatatagtgaatcaatgggccttcataggtgaaaagtgtattc
acggtacccccttcaggaatagataacgctgtggccacttatggtaatgccctgctatttgaaaaagactcacataat
ggaacaataaacacaaacaatttttaagttcttagatgatttcccagccattccaatgatcctaacctatactagaatt
ccaaggtctacaaaagatctgttgctcgcgttcgtgtgttggtcaccgagaaatttcctgaagttatgaagccaattc
tagatgccatgggtgaatgtgccctacaaggcttagagatcatgactaagttaagtaaatgtaaaggcaccgatg
acgaggctgtagaaactaataatgaactgtatgaacaactattggaattgataagaataaatcatggactgcttgt
ctcaatcggtgtttctcatcctggattagaacttattaaaaatctgagcgatgatttgagaattggctccacaaaactt
accggtgctggtggcggcggttgctcttgacttgttacgaagagacattactcaagagcaaattgacagcttcaa
aaagaaattgcaagatgattttagt

Fig. 29B


tacgagacattgaaacagacttgggtgggactggctgctgttgttaagcgcaaaaaatttgaataaagatcttaa
aatcaaatccctagtattccaattatttgaaaataaaactaccacaaagcaacaaattgacgatctattattgccag
gaaacacgaatttaccatggacttcataaaaggagagggtgtcagagttgagagccttcagtgccccagggaa
agcgttactagctggtggatatttagttttagatacaaaatatgaagcatttgtagtcggattatcggcaagaatgcat
gctgtagcccatccttacggttcattgcaagggtctgataagtttgaagtgcgtgtgaaaagtaaacaatttaaagat
ggggagtggctgtaccatataagtcctaaaagtggcttcattcctgtttcgataggcggatctaagaaccctttcattg
aaaaagttatcgctaacgtatttagctacttaaacctaacatggacgactactgcaatagaaacttgttcgttattga
tatttctctgatgatgcctaccatttctcaggaggatagcgttaccgaacatcgtggcaacagaagattgagttttcatt
cgcacagaattgaagaagttcccaaaacagggctgggctcctcggcaggtttagtcacagttttaactacagcttt
ggcctcctttttgtatcggacctggaaaataatgtagacaaatatagagaagttattcataatttagcacaagttgct
cattgtcaagctcagggtaaaattggaagcgggttgatgtagcggcggcagcatatggatctatcagatatagaa
gattcccaccgcattaatctctaatttgccagatattggaagtgctacttacggcagtaaactggcgcatttggttga
tgaagaagactggaatattacgattaaaagtaaccatttaccttcgggattaacttttatggatgggcgatattaaga
atggttcagaaacagtaaaactggtccagaaggtaaaaaattggtatgattcgcatatgccagaaagcttgaaaa
tatatacagaactcgatcatgcaaattctagatttatggatggactatctaaactagatcgcttacacgagactcatg
acgattacagcgatcagatattgagtctcttgagaggaatgactgtacctgtcaaaagtatcctgaaatcacaga
agttagagatgcagttgccacaattagacgttcctttagaaaaataactaaagaatctggtgccgatatcgaacct
cccgtacaaactagcttattggatgattgccagaccttaaaaggagttcttacttgcttaatacctggtgctggtggtta
tgacgccattgcagtgattactaagcaagatgttgatcttagggctcaaaccgctaatgacaaaagatttctaagg
ttcaatggctggatgtaactcaggctgactggggtgttaggaaagaaaaagatccggaaacttatcttgataaata
aaaggagagggtgaccgtttacacagcatccgttaccgcacccgtcaacatcgcaacccttaagtattgggggа
aaagggacacgaagttgaatctgcccaccaattcgtccatatcagtgactttatgcaagatgacctcagaacgtt
gacctctgcggctactgcactgagttgaacgcgacactttgtggttaaatggagaaccacacagcatcgacaa
tgaaagaactcaaaattgtctgcgcgacctacgccaattaagaaaggaaatggaatcgaaggacgcctcattgc
ccacattatctcaatggaaactccacattgtctccgaaaataacttcctacagcagctggtttagcttcctccgctgc
tggctttgctgcattggtctctgcaattgctaagttataccaattaccacagtcaacttcagaaatatctagaatagca
agaaaggggtctggttcagcttgtagatcgttgttggcggatacgtggcctgggaaatgggaaaagctgaagat
ggtcatgattccatggcagtacaaatcgcagacagctctgactggcctcagatgaaagcttgtgtcctagttgtcag
cgatattaaaaaggatgtgagttccactcagggtatgcaattgaccgtggcaaccteegaaciatttaaagaaag
aattgaacatgtcgtaccaaagagattgaagtcatgcgtaaagccattgttgaaaaagatttcgccaccttgcaa
aggaaacaatgatggattccaactcttccatgccacatgttggactcttccctccaatatctacatgaatgacac
ttccaagcgtatcatcagttggtgccacaccattaatcagttttacggagaaacaatcgttgcatacacgttgatgc
aggtccaaatgctgtgttgtactacttagctgaaaatgagtcgaaacictttgcatttatctataaattgtttggctctgtt
cctggatgggacaagaaattactactgagcagcttgaggcttcaaccatcaatttgaatcatctaacttactgca
cgtgaattggatcttgagttgcaaaaggatgttgccagagtgattttaactcaagtcggttcaggcccacaagaaa
caaacgaaictttgattgacgcaaagactggtctaccaaaggaataaaaggagagggtgactgccgacaaca
atagtatgccccatggtgcagtatctagttacgccaaattagt

Fig. 29C

gcaaaaccaaacacctgaagacattttggaagagtttcctgaaattattccattacaacaaagacctaataccg
atctagtgagacgtcaaatgacgaaagcggagaaacatgttttctggtcatgatgaggagcaaattaagttaatg
aatgaaaattgtattgttttggattgggacgataatgctattggtgccggtaccaagaaagttgtcatttaatggaaa
atattgaaaagggtttactacatcgtgcattctccgtctttatttttcaatgaacaaggtgaattacttttacaacaaaga
gccactgaaaaaataacttttcctgatctttggactaacacatgctgctctcatccactatgtattgatgacgaattag
gtttgaagggtaagctagacgataagattaagggcgctattactgcggcggtgagaaaactagatcatgaattag
gtattccagaagatgaaactaagacaagggtaagtttcacttttaaacagaatccattacatggcaccaagca
atgaaccatggggtgaacatgaaattgattacatcctatttttataagatcaacgctaaagaaaacttgactgtcaac
ccaaacgtcaatgaagttagagacttcaaatgggtttcaccaaatgatttgaaaactatgtttgctgacccaagtta
caagtttacgccttggtttaagattatttgcgagaattacttattcaactggtgggagcaattagatgaccttctgaagt
ggaaaatgacaggcaaattcatagaatgctataaaaaaaaaccggccttggccccgccggttttttattatttttcttcc
tccgcatgttcaatccgctccataatcgacggatggctccctctgaaaattttaacgagaaacggcgggtgaccc
ggctcagtcccgtaacggccaagtcctgaaacgtctcaatcgccgctcccggtttcgggtcagctcaatgccgta
acggtcggcggcgttttctgataccgggagacggcattcgtaattgaatacatacgaacaaattaataaagtga
aaaaaatacttcggaaacatttaaaaaaataaccttattggtacttacatgtttggatcaggagttgagagtggacta
aaaccaaatagtgatcttgacttttagtcgtcgtatctgaaccattgacagatcaaagtaaagaaatacttatacaa
aaaattagacctatttcaaaaaaaataggagataaaagcaacttacgatatattgaattaacaattattattcagca
agaaatggtaccgtggaatcatcctcccaaacaagaatttattatggagaatggttacaagagcttatgaaacaa
ggatacattcctcagaaggaattaaattcagatttaaccataatgctttaccaagcaaaacgaaaaaaataaaaga
atatacggaaaattatgacttagaggaattactacctgatattccatttctgatgtgagaagagccattatggattcgtc
agaggaattaatagataattatcaggatgatgaaaccaactctatattaacttatgccgtatgatttaactatggac
acgggtaaaatcataccaaaagatattgcgggaaatgcagtggctgaatcttctccattagaacatagggagag
aatttgttagcagttcgtagttatcttggagagaatattgaatggactaatgaaaatgtaaatttaactataaactattt
aaataacagattaaaaaaattataatgtaaccttgctttcaaatgagtagaaataatgcacatccatgttgtatcgt
gcaaataaagtgtttcatccgtaggaaaaaatgacttagtatctgttccgcttttctgatgaaatgtgctcccgaca
aaattgaatgaatcatggacattgctggcttgatacagcgaaagcagccgttcctatgttatatatcggatttaaca
gcaggacaaaaaaacaccatgacagccatcgtcacccacttattcacacgcacataaaccttccctgacttttgga
acagatgatagctcatcaaaaatcccgccattgccaaataaatcgtatatggcattactgcaccataatctttgag
atttgattgggatatggcgcaagcagcaagacaagcagtccgataatcagcgtataaaataagcctagtaagat
cttatccgttctccaatacagcttgaaaaacactacattcaacgcaatgggaagagtgatgatgaaaaacagaaa
cacgaatgcaatcggctccatcccatccgggtattcattccaatacgaaaagaaactaaaaatcatttgtacgatc
ggcaaactgacaacagcaaggtcgaacgtataaaacttacccttccgccatgatcacgcggcatcagcatata
gtgaaaagccgtcagcagcacatatccgtataacaaaaaatgcagcagcggcagcagttcttttccgtcctctctt
aagtaagcgctggtgaagtttgttgattgcacctggtgaataagttcaacagacactcccgccagcagcacaatc
cgcaatataacacccgccaagaacattgtgcgctgccggtttatttttgggatgatgcaccaaaagatataagccc
gccagaacaacaattgaccattgaatcagcagggtgcttgtctgcttaatataaaataacgttcgaaatgcaata
cataatgactgaataactccaacacgaacaacaaaagtgcgcatttt

Fig. 29D

Ataaaagctaatgattcagtccacataattgatagacgaattctgctacaggtcacgtggctatgtgaaggatcgc
gcgtccagttaagagcaaaaacattgacaaaaaaattiattiatgctaaaatttactattaatatattgtatgtataat
aagattctcctggccaggggaatcttatttttgtggaggatcatttcatgaggaaaaatgagtccagcttaacgtctc
taatttcagcttttgcccgtgcatatcacagccgatatgacacacctcttatttttgatgatttatcgcaaaagatctcat
taacgaaaaaagagtttatcgacatcagtaaaaatatgattcaagaaatatcgttttttcaacaaagagatcgccgaa
cgtcttcaaaatgatcctgaaaaaatattaaaatgggttgcacaaatccagctgtctccaacgcccctagcacgtg
cttcttattgtgaaaaagtcttgcacaacgaattaatcctgggggcaaaacagtatgtcatttctggagcgggactg
gatacttictgcttcggcatccagaattagaaaacagcttacaggtttcgaggttgatcatccggccacacagca
attgaaaaaaaaataagctgaaggatgcaaatctgacaattccgggtcatcttcatttgttcctatggatttcaccaa
aacgttttcgtatgatcctcicttagatgaaggatttaaaaacacaaaaacattcttcagccttctcggagtgtcttatt
atgtaacacgggaagaaaatgcaagcttgatcagcaatttatttctcatgtcccgcctggaagctctattgttttgat
tatgcggacgaaacacttttacagcaaaagggacgtcgaatcgagttgaacatatggtgaagatggctgccgc
aagcggggaaccgatgaaatcatgttcacttatcaagagattgaacatctg

(SEQ ID NO:47)

Fig. 30

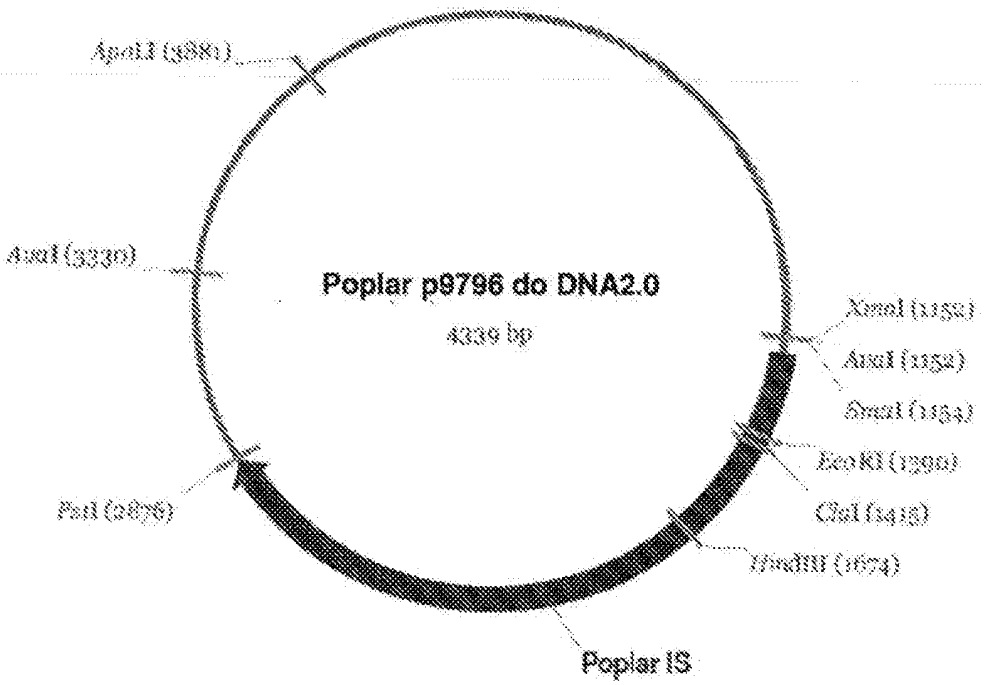

ApaLI (3681)
AscI (3330)
PacI (2876)
Poplar p9796 do DNA2.0
4339 bp
XmaI (1152)
AscI (1152)
SmaI (1154)
EcoRI (1200)
ClaI (1418)
HindIII (1674)
Poplar IS

Fig. 31A

5'-
tagaaaaactcatcgagcatcaaatgaaactgcaatttattcatatcaggattatcaataccatatttttgaaaaagcc
cgtttctgtaatgaaggagaaaactcaccgaggcagttccataggatggcaagatcctggtatcggtctgcgattc
cgactcgtccaacatcaatacaacctattaatttcccctcgtcaaaaataaggttatcaagtgagaaatcaccatg
agtgacgactgaatccggtgagaatggcaaaagtttatgcatttctttccagacttgttcaacaggccagccattac
gctcgtcatcaaaatcactcgcatcaaccaaaccgttattcattcgtgattgcgcctgagcgaggcgaaatacgcg
atcgctgttaaaaggacaattacaaacaggaatcgagtgcaaccggcgcaggaacactgccagcgcatcaac
aatattttcacctgaatcaggatattcttctaatacctggaacgctgtttttccggggatcgcagtggtgagtaaccatg
catcatcaggagtacggataaaatgcttgatggtcggaagtggcataaattccgtcagccagtttagtctgaccatc
tcatctgtaacatcattggcaacgctaccttgccatgttcagaaacaactctggcgcatcgggcttcccatacaag
cgatagattgtcgcacctgattgcccgacattatcgcgagcccatttatacccatataaatcagcatccatgttggaa
tttaatcgcggcctcgacgtttcccgttgaatatggctcataacaccccttgtattgccttcgcccatacaag
gtcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataaacaaataggggtcagtgttacaaccaattaaccaa
attctgaacattatcgcgagcccatttatacctgaatatggctcataacaccccttgtttgcctggcggcagtagcgc
ggtggtcccacctgaccccatgccgaactcagaagtgaaacgccgtagcgccgatggtagtgtggggactccc
catgcgagagtagggaactgccaggcatcaaataaaacgaaaggctcagtcgaaagactgggccttttcgccc
gggctaattagggggtgtcgcccttagtcgctgaacatgtgctctgtttctaccgagaacgtttccttcactgagacg
gaaaccgaggcacgtcgtagcgcgaactacgagccgaatagctgggactacgatttcctgctgtcttccgatact
gacgaatctattgaggtgtacaaagacaaagcaaagaaactggaggctgaagtgcgccgcgaaattaacaac
gagaaagctgaattccgactctgctggagctgatcgataacgtacagcgcctgggtctgggttaccgcttcgaat
ctgatatccgtcgcgcactggatcgtttcgtaagcagcggcggtttcgatggcgtgaccaaaacgagcctgcacg
ctaccgcgctgtccttccgtctgctgcgtcagcacggcttcgaagtttctcaggaagcattctccggtttcaaagatc
aaaacggtaacttcctggaaaacctgaaagaagacactaaggcgatcctgagcctgtatgaggcaagctttctg
gccctggagggtgagaacatcctggatgaggcgcgctattccatctcccatctgaaagagctgtctgaaga
gaaaatcggtaaggaactggcagagcaggttaatcacgcactggaactgccgctgcatcgtcgtacccagcgtc
tggaggcggtttggtccatcgaagcgtaccgcaaaaaggaggatgctaaccaggttctgctggaactggccatc
ctggactacaacatgatccagtccgtttaccagcgtgatctgcgtgaaacctcccgttggtggcgccgtgtgggcct
ggcgaccaaactgcacttcgctaaggacgcctgatgagtctttttactgggcagtcggcgttgcgttcgaacctc
agtattctgactgccgtaacagcgttgcgaaaatgttcagcttcgttactattatcgacgacatctacgacgtttacgg
tactctggacgagctggaactgtttaccgacgctgtcgaacgttgggatgttaacgccatcaacgatctgcctgact
acatgaaactgtgcttcctggcactgtataacacgatcaacgaaattgcatacgacaacctgaaagacaaaggt
gaaaacatcctgccgtacctgactaaagcgtgggcggatctgtgtaacgcttttctgcaagaagcgaaatggctgt
ataacaaatccactccgaccttgacgattatttcggcaatgcctggaaatccagctctggcccgctgcaactgatc
ttcgcttatttgcggtgtccaaaacatcaaaaaggaggaaattgaaaacctgcaaaaatacccacgatatcatta
gccgtccttctcatatctttcgcctgtgcaacgacctggcaagcgcgtccgcagagatcgcacgtggcgaaaccg
ctaactctgtttcctgctacatgcgcaccaagggcatttccgaagagctggcaaccgagagcgtaatgaatctgat
cgacgaaacctgtaagaaaatgaacaaagaaaaactgggtggctcccgttcgctaaaccgttcgtagagactg
ctattaacct

Fig. 31B

ggcacgtcagagccactgcacctaccacaatggtgacgcacatactagcccggatgaactgactcgtaaaacgt
gtacigtctgttatcaccgaaccgatictgccgttcgaacgttaactgcagcgtcaatcgaaagggcgacacaaa
attiattctaaatgcataataaaatactgataacatcttatagtttgtattatatttgtattatcgttgacatgtataatttigat
atcaaaaactgattticcctttaltatttiogagatttattttcttaattctcttaacaaactagaaatattgtatatacaaaa
aatcataaaataaiagatgaatagtttaattataggtgttcatcaatcgaaaaagcaacgtatcttatttaaagtgcgtt
gcttttttctcatttataaggttaaataaattctcatatatcaagcaaagtgacaggcgcccttaaatattcigacaaatg
ctctttccctaaactcccccccataaaaaaaacccgccgaagcgggtttttacgttatttgcggattaacgattactcgtt
atcagaaccgcccagggggcccgagcttaagactggccgtcgttttacaacacagaaagagtttgtagaaaacg
caaaaaggccatccgtcaggggccttctgcttagtttgatgcctggcagtttccctactctgccttccgctcctctgct
cactgactcgctgcgctcggtcgttcggctgcggcgagcggtatcagctcactcaaaggcggtaatacggttatcc
acagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaa
aaggccgcgttgctggcgtttttccataggctccgccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcag
aggtggcgaaacccgacaggactataaagataccaggcgtttccccctggaagctccctcgtgcgctctcctgtt
ccgaccctgccgcttaccggatacctgtccgcctttctcccttcgggaagcgtggcgctttctcatagctcacgcigt
aggtatctcagttcggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaaccccccgttcagcccgaccgct
gcgccttatccggtaactatcgtcttgagtccaacccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactg
gtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcggtgctacagagttcttgaagtggtgggctaactacggctaca
ctagaagaacagtatttggtatctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccg
gcaaacaaaccaccgctggtagcggtggtttttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatctc
aagaagatcctttgatcttttctacggggtctgacgctcagtggaacgacgcgcgcgtaactcacgttaagggatttt
ggtcatgagcttgcgccgtcccgtcaagtcagcgtaatgctctgctit

(SEQ ID NO:48)

Fig. 32

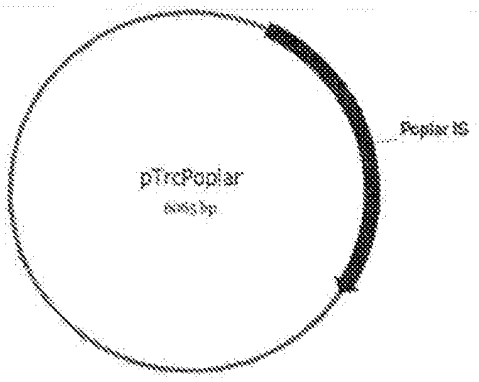


Fig. 33A

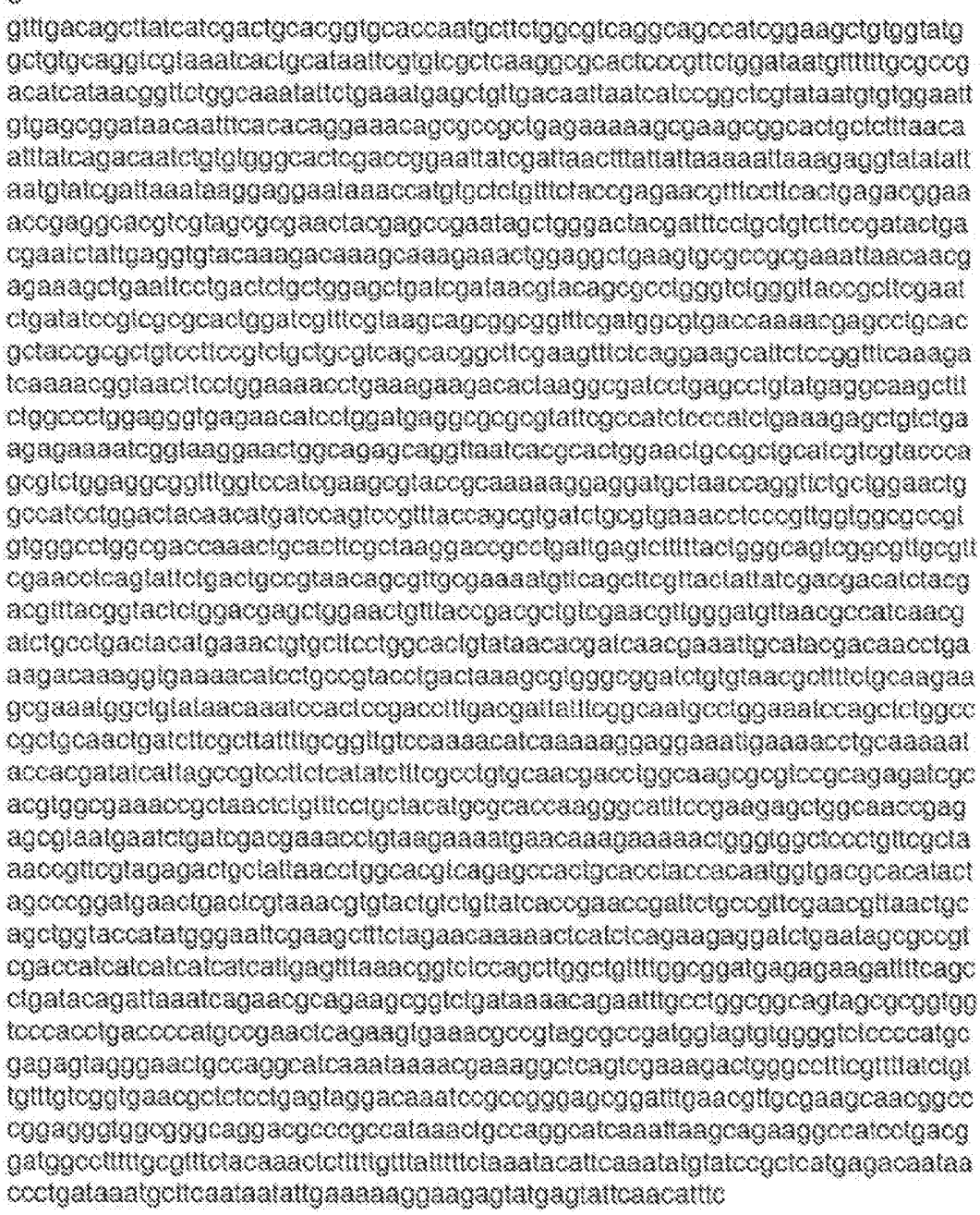

5'-
gtttgacagcttatcatcgactgcacggtgcaccaatgcttctggcgtcaggcagccatcggaagctgtggtatg
gctgtgcaggtcgtaaatcactgcataattcgtgtcgctcaaggcgcactcccgttctggataatgtttttgcgccg
acatcataacggttctggcaaatattctgaaatgagctgttgacaattaatcatccggctcgtataatgtgtggaatt
gtgagcggataacaatttcacacaggaaacagcgccgctgagaaaaagcgaagcggcactgctctttaaca
atttatcagacaatctgtgtgggcactcgaccggaattatcgattaactttattattaaaaattaaagaggtatatatt
aatgtatcgattaaataaggaggaataaaccatgtgctctgtttctaccgagaacgtttccttcactgagacggaa
accgaggcacgtcgtagcgcgaactacgagccgaatagctgggactacgatttcctgctgtcttccgatactga
cgaatctattgaggtgtacaaagacaaagcaaagaaactggaggctgaagtgcgccgcgaaattaacaacg
agaaagctgaattcctgactctgctggagctgatcgataacgtacagcgcctgggtctgggttaccgcttcgaat
ctgatatccgtcgcgcactggatcgtttcgtaagcagcggcggtttcgatggcgtgaccaaaacgagcctgcac
gctaccgcgctgtccttccgtctgctgcgtcagcaccggcttcgaagtttctcaggaagcattctccggtttcaaaga
tcaaaacggtaacttcctggaaaacctgaaagaagacactaaggcgatcctgagcctgtatgaggcaagctttt
ctggccctggagggtgagaacatcctggatgaggcgcgcgtattgccatctcccatctgaaagagctgtctga
agagaaaatcggtaaggaactggcagagcaggttaatcacgcactggaactgccgctgcatcgtcgtaccca
gcgtctggaggcggtttggtccatcgaagcgtaccgcaaaaaggaggatgctaaccaggttctgctggaactg
gccatcctggactacaacatgatccagtccgtttaccagcgtgatctgcgtgaaacctcccgttggtggcgccgt
gtgggcctggcgaccaaactgcacttcgctaaggaccgcctgattgagtcttttacttgggcagtcggcgttgcgtt
cgaacctcagtattctgactgccgtaacagcgttgcgaaaatgttcagcttcgttactattatcgacgacatctacg
acgtttacggtactctggacgagctggaactgttaccgacgctgtcgaacgttgggatgttaacgccatcaacg
atctgcctgactacatgaaactgtgcttcctggcactgtataacacgatcaacgaaattgcatacgacaacctga
aagacaaaggtgaaaacatcctgccgtacctgactaaagcgtgggcggatctgtgtaacgcttttctgcaagaa
gcgaaatggctgtatacaaatccactccgaccttgacgattatttcggcaatgcctggaaatccagctctggcc
cgctgcaactgatcttcgcttatttgcggttgtccaaaacatcaaaaaggaggaaatgaaaacctgcaaaaat
accacgatatcattagccgtccttctatatctttcgcctgtgcaacgacctggcaagcgcgtccgcagagatcgc
acgtggcgaaaccgctaactctgtttcctgctacatgcgcaccaagggcattccgaagagctggcaaccgag
agcgtaatgaatctgatcgacgaaacctgtaagaaaatgaacaaagaaaaactgggtggctccctgttcgcta
aacgttcgtagagactgctattaacctggcacgtcagagccactgcacctaccacaatggtgacgcacatact
agcccggatgaactgactcgtaaacgtgtactgtctgttatcacgaaccgattctgccgttcgaacgttaactgc
agctggtaccatatgggaattcgaagctttctagaacaaaaactcatctcagaagaggatctgaatagcgccgt
cgaccatcatcatcatcatcattgagtttaaacggtctccagcttggctgttttggcggatgagagaagattttcagc
ctgatacagattaaatcagaacgcagaagcggtctgataaaacagaatttgcctggcggcagtagcgcggtgg
tcccacctgaccccatgccgaactcagaagtgaaacgccgtagcgccgatggtagtgtggggtctccccatgc
gagagtagggaactgccaggcatcaaataaaacgaaaggctcagtcgaaagactgggccttcgttttatctgt
tgtttgtcggtgaacgctctcctgagtaggacaaatccgccgggagcggatttgaacgttgcgaagcaacggcc
cggagggtgcggcaggacgcccgccataaactgccaggcatcaaattaagcagaaggccatcctgacg
gatggcctttttgcgtttctacaaactcttttgtttatttttctaaatacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataa
ccctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagagtatgagtattcaacatttc

Fig. 33B

cgtgtcgcccttattcccttttttgcggcatttgccttcctgtttttgctcacccagaaacgctggtgaaagtaaaagatg
ctgaagatcagttgggtgcacgagtgggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagttttcgc
cccgaagaacgttttccaatgatgagcacttttaaagttctgctatgtggcgcggtattatcccgtgttgacgccgggc
aagagcaactcggtcgccgcatacactattctcagaatgacttggttgagtactcaccagtcacagaaaagcatctt
acggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgctgccataaccatgagtgataacactgcggccaacttacttct
gacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgcttttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgccttgatcgtt
gggaaccggagctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaa
cgttgcgcaaactattaactggcgaactacttactctagcttcccggcaacaattaatagactggatggaggcggat
aaagttgcaggaccacttctgcgctcggcccttccggctggctggtttattgctgataaatctggagccggtgagcgt
gggtctcgcggtatcattgcagcactggggccagatggtaagccctcccgtatcgtagttatctacacgacgggga
gtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgctgagataggtgcctcactgattaagcattggtaactgtc
agaccaagtttactcatatatactttagattgatttaaaacttcatttttaatttaaaaggatctaggtgaagatccttttga
taatctcatgaccaaaatcccttaacgtgagttttcgttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggat
cttcttgagatcctttttttctgcgcgtaatctgctgcttgcaaacaaaaaaaccaccgctaccagcggtggtttgtttgc
cggatcaagagctaccaactctttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaaatactgtccttcta
gtgtagccgtagttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgctctgctaatcctgttacca
gtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttggactcaagacgatagttaccggataaggcgcagc
ggtcgggctgaacggggggttcgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacctacaccgaactgagataccta
cagcgtgagctatgagaaagcgccacgcttcccgaagggagaaaggcggacaggtatccggtaagcggcagg
gtcggaacaggagagcgcacgagggagcttccagggggaaacgcctggtatcttatagtcctgtcgggtttcgcc
acctctgacttgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcaggggggcggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggc
ctttttacggttcctggccttttgctggccttttgctcacatgttctttcctgcgttatcccctgattctgtggataaccgtattac
cgccttgagtgagctgataccgctcgccgcagccgaacgaccgagcgcagcgagtcagtgagcgaggaagcg
gaagagcgcctgatgcggtatttctccttacgcatctgtgcggtatttcacaccgcatatggtgcactctcagtacaat
ctgctctgatgccgcatagttaagccagtatacactccgctatcgctacgtgactgggtcatggctgcgccccgaca
cccgccaacacccgctgacgcgccctgacgggcttgtctgctcccggcatccgcttacagacaagctgtgaccgtc
tccgggagctgcatgtgtcagaggttttcaccgtcatcaccgaaacgcgcgaggcagcagatcaattcgcgcgcg
aaggcgaagcggcatgcatttacgttgacaccatcgaatggtgcaaaacctttcgcggtatggcatgatagcgccc
ggaagagagtcaattcagggtggtgaatgtgaaaccagtaacgttatacgatgtcgcagagtatgccgggtgtctctt
atcagaccgtttcccgcgtggtgaaccaggccagccacgtttctgcgaaaacgcgggaaaaagtggaagcggc
gatggcggagctgaattacattcccaaccgcgtggcacaacaactggcgggcaaacagtcgttgctgattggcgtt
gccacctccagtctggccctgcacgcgccgtcgcaaattgtcgcggcgattaaatctcgcgccgatcaactgggtg
ccagcgtggtggtgtcgatggtagaacgaagcggcgtcgaagcctgtaaagcggcggtgcacaatcttctcgcgc
aacgcgtcagtgggctgatcattaactatccgctggatgaccaggatgccattgctgtggaagctgcctgcactaat
gttccggcgttatttcttgatgtctctgaccagacacccatcaacagtattatttttctcccatgaagacggtacgcgact
gggcgtggagcatctggtcgcattgggtcaccagcaaatcgcgctgttagcgggcccattaagttctgtctcggcgc
gtctgcgtctggctggctggcataaatatctcactcgcaatc

Fig. 33C

aaatcagccgatagcggaacgggaaggcgactggagtgccatgtccggttttcaacaaaccatgcaaatgctgaa
tgagggcatcgttcccactgcgatgctggttgccaacgatcagatggcgctgggcgcaatgcgcgccattaccgagt
ccgggctgcgcgttggtgcggatatctcggtagtgggatacgacgataccgaagacagctcatgttatatcccgccgt
caaccaccatcaaacaggattttcgcctgctggggcaaaccagcgtggaccgcttgctgcaactctctcagggcca
ggcggtgaagggcaatcagctgttgcccgtctcactggtgaaaagaaaaaccaccctggcgcccaatacgcaaac
cgcctctccccgcgcgttggccgattcattaatgcagctggcacgacaggtttcccgactggaaagcgggcagtgag
cgcaacgcaattaatgtgagttagcgcgaattgatctg

(SEQ ID NO:49)

Fig. 34

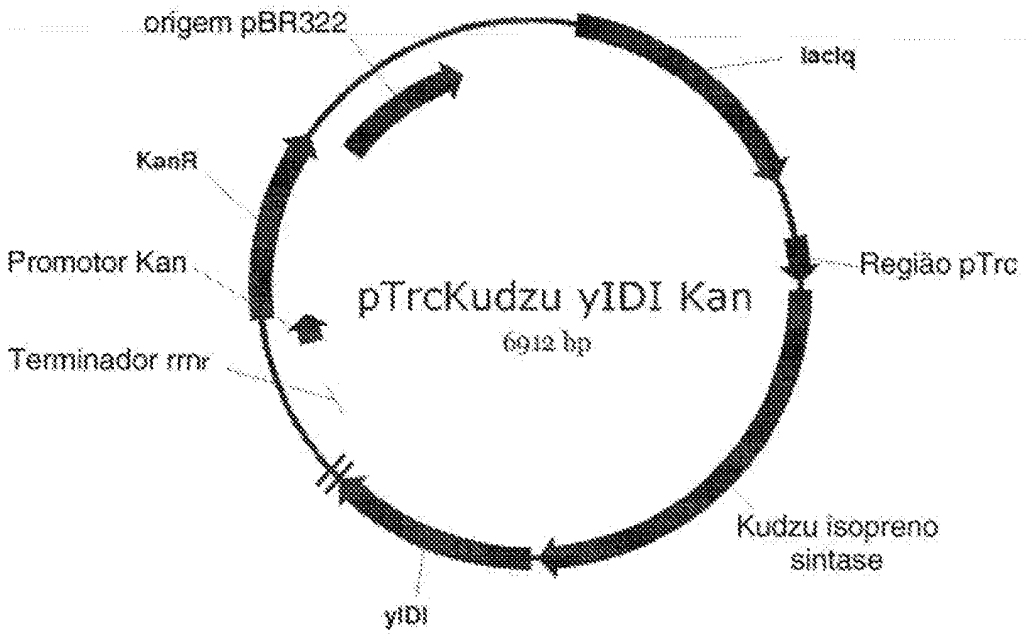

origem pBR322
lacIq
KanR
Promotor Kan
Região pTrc
pTrcKudzu yIDI Kan
6912 bp
Terminador rrnr
Kudzu isopreno sintase
yIDI

Fig. 35A

5'-
ttgtctgctcccggcatccgcttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcagaggttttcaccgtc
atcaccgaaacgcgcgaggcagcagatcaattcgcgcgcgaaggcgaagcggcatgcattacgttgacacc
atcgaatggtgcaaaacctttcgcggtatggcatgatagcgcccggaagagagtcaattcagggtggtgaatgtg
aaaccagtaacgttatacgatgtcgcagagtatgccggtgtctcttatcagaccgtttcccgcgtgggtgaaccagg
ccagccacgtttctgcgaaaacgcgggaaaaagtggaagcggcgatggcggagctgaattacattcccaacc
gcgtggcacaacaactggcgggcaaacagtcgttgctgattggcgttgccacctccagtctggccctgcacgcg
ccgtcgcaaattgtcgcggcgattaaatctcgcgccgatcaacgggtgccagcgtggtggtgtcgatggtagaa
cgaagcggcgtcgaagcctgtaaagcggcggtgcacaatcttctcgcgcaacgcgtcagtgggctgatcattaa
ctatccgctggatgaccaggatgccattgctgtggaagctgcctgcactaatgttccggcgttatttcttgatgtctctg
accagacacccatcaacagtattattttctcccatgaagacggtacgcgactgggcgtggagcatctggtcgcatt
gggtcaccagcaaatcgcgctgttagcgggcccattaagttctgtctcggcgcgtctgcgtctggctggctggcata
aatatctcactcgcaatcaaattcagccgatagcggaacgggaaggcgactggagtgccatgtccggtttcaac
aaaccatgcaaatgctgaatgagggcatcgttcccactgcgatgctggttgccaacgatcagatggcgctgggc
gcaatgcgcgccattaccgagtccgggctgcgcgttggtgcggatatctcggtagtgggatacgacgataccga
agacagctcatgttatatcccgccgtcaaccaccatcaaacaggattttcgcctgctggggcaaaccagcgtgga
ccgcttgctgcaactctctcagggccaggcggtgaagggcaatcagctgttgcccgtctcactggtgaaaagaaa
aaccaccctggcgcccaatacgcaaaccgcctctccccgcgcgttggccgattcattaatgcagctggcacgac
aggtttcccgactggaaagcgggcagtgagcgcaacgcaattaatgtgagttagcgcgaattgatctggtttgac
agcttatcatcgactgcacggtgcaccaatgcttctggcgtcaggcagccatcggaagctgtggtatggctgtgca
ggtcgtaaatcactgcataattcgtgtcgctcaaggcgcactcccgttctggataatgttttttgcgccgacatcataa
cggttctggcaaatattctgaaatgagctgttgacaattaatcatcggctcgtataatgtgtggaattgtgagcggat
aacaatttcacacaggaaacagcgccgctgagaaaaagcgaagcggcactgctctttaacaatttatcagaca
atctgtgtgggcactcgaccggaattatcgattaactttattattaaaaattaaagaggtatatattaatgtatcgatta
aataaggaggaataaaccatgtgtgcgaccctcttctcaatttactcagattaccgagcataattcccgtcgttccgc
aaactatcagccaaacctgtggaatttcgaattcctgcaatccctggagaacgacctgaaagtggaaaagctgg
aggagaaagcgaccaaactggaggaagaagttcgctgcatgatcaaccgtgtagacacccagccgctgtccct
gctggagctgatcgacgatgtgcagcgcctgggtctgacctacaaatttgaaaaagacatcattaaagccctgga
aaacatcgtactgctggacgaaaacaaaaagaacaaatctgacctgcacgcaaccgctctgtctttccgtctgct
gcgtcagcacggttcgaggtttctcaggatgttttgagcgttttcaaggataaagaaggtggtttcagcggtgaact
gaaaggtgacgtccaaggcctgctgagcctgtatgaagcgtcttacctgggtttcgagggtgagaacctgctgga
ggaggcgcgtacctttttccatcacccacctgaagaacaacctgaaagaaggcattaataccaaggttgcagaac
aagtgagccacgccctggaactgccatatcaccagcgtctgcaccgtctggaggcacgttggttcctggataaat
acgaaccgaaagaaccgcatcaccagctgctgctggagctggcgaagctggatttaacatggtacagaccctg
caccagaaagagctgcaagatctgtccgctggtggaccgagatgggcctggctagcaaacttggatttgtacg
cgacgcctgatggaagtttatttctgggcactgggtatggcgccagacccgcagtttggtgaatgtcgcaaagct
gttactaaaatgtttggtctggtgacgatcatcgatgacgtgtatgacgt

Fig. 35B

ttatggcactctggacgaactgcaactgttcaccgatgctgtagagcgctgggacgttaacgctattaacaccct
gccggactatatgaaactgtgtttcctggcactgtacaacaccgttaacgacacgtcctattctattctgaaagag
aaaggtcataacaacctgtcctatctgacgaaaagctggcgtgaactgtgcaaagccttctgcaagaggcg
aaatggtccaacaacaaaattatcccggctttctccaagtacctggaaaacgccagcgtttcctcctcggtgt
agcgctgctggcgccgtcttacttttccgtatgccagcagcaggaagacatctccgaccacgcgctgcgttccc
tgaccgacttccatggtctggtgcgttctagctgcgttatcttccgcctgtgcaacgatctggccacctctgcggcg
gagctggaacgtggcgagactaccaattctatcattagctacatgcacgaaaacgatggtaccagcgaggaa
acaggcccgcgaagaactgcgtaaactgatcgacgccgaatggaaaaagatgaatcgtgaacgcgttagc
gactccacgctgctgcctaaagcgttcatggaaatcgcagttaacatggcacgtgtttcccactgcacctacca
gtatggcgatggtctgggtcgcccagactacgcgactgaaaaccgcatcaaactgctgctgattgacccttccc
cgattaaccagctgatgtatgtctaactgcatcgcccttaggaggtaaaaaaaaaatgactgccgacaacaata
gtatgccccatggtgcagtatctagttacgccaaattagtgcaaaaccaaacacctgaagacatttggaaga
gtttcctgaaattattccattacaacaaagacctaataccgatctagtgagacgtcaaatgacgaaagcgga
gaaacatgtttttctggtcatgatgaggagcaaattaagttaatgaatgaaaattgtattgttttggattgggacgat
aatgctattggtgccggtaccaagaaagttgtcatttaatggaaaatattgaaaagggtttactacatcgtgcatt
ctccgtctttatttcaatgaacaaggtgaattactttacaacaaagagccactgaaaaaataacttttcctgatc
tttggactaacacatgctgctctcatccactatgtattgatgacgaattaggtttgaagggtaagctagacgataa
gattaagggcgctattactgcggcggtgagaaaactagatcatgaattaggtattccagaagatgaaactaag
acaaggggtaagtttcacttttttaaacagaatccattacatggcaccaagcaatgaaccatggggtgaacatg
aaattgattacatcctatttttataagatcaacgctaaagaaaacttgactgtcaacccaaacgtcaatgaagtta
gagacttcaaatgggtttcaccaaatgatttgaaaactatgtttgctgacccaagttacaagtttacgcctggttta
agattatttgcgagaattacttattcaactggtgggagcaattagatgacctttctgaagtggaaaatgacaggc
aaattcatagaatgctataacaacgcgtcctgcagctggtaccatatgggaattcgaagcttctagaacaaaa
actcatctcagaagaggatctgaatagcgccgtcgaccatcatcatcatcattgagtttaaacggtctccag
cttggctgttttggcggatgagagaagattttcagcctgatacagattaaatcagaacgcagaagcggtctgat
aaaacagaattgcctggcggcagtagcgcggtggtcccacctgaccccatgccgaactcagaagtgaaac
gccgtagcgccgatggtagtgtggggtctccccatgcgagagtagggaactgccaggcatcaaataaaacg
aaaggctcagtcgaaagactgggccttcgttttatctgttgtttgtcggtgaacgctctcctgagtaggacaaatc
cgccgggagcggatttgaacgttgcgaagcaacggcccggagggtggcgggcaggacgcccgccataaa
ctgccaggcatcaaattaagcagaaggccatcctgacggatggcctttttgcgtttctacaaactctttttgtttatti
ttctaaatacattcaaatatgtatccgcttaaccggaattgccagctggggcgccctctggtaaggttgggaagc
cctgcaaagtaaactggatggctttctcgccgccaaggatctgatggcgcaggggatcaagctctgatcaag
agacaggatgaggatcgtttcgcatgattgaacaagatggattgcacgcaggttctccggccgcttgggtgga
gaggctattcggctatgactgggcacaacagacaatcggctgctctgatgccgccgtgttccggctgtcagcg
cagggggcgcccggttctttttgtcaagaccgacctgtccggtgccctgaatgaactgcaagacgaggcagcg
cggctatcgtggctggccacgacgggcgttccttgcgcagctgtgctcgacgttgtcactgaagcgggaaggg
actggctgctattgggcgaagtgccggggcaggatctcctgtcatctcaccttgctcctgccgagaaagtatcc
atcatggctgat

Fig. 35C

gcaatgcggcggctgcatacgcttgatccggctacctgcccattcgaccaccaagcgaaacatcgcatcgagcg
agcacgtactcggatggaagccggtcttgtcgatcaggatgatctggacgaagagcatcaggggctcgcgcca
gccgaactgttcgccaggctcaaggcgagcatgcccgacggcgaggatctcgtcgtgacccatggcgatgcct
gcttgccgaatatcatggtggaaaatggccgcttttctggattcatcgactgtggccggctgggtgtggcggaccgc
tatcaggacatagcgttggctacccgtgatattgctgaagagcttggcggcgaatgggctgaccgcttcctcgtgct
ttacggtatcgccgctcccgattcgcagcgcatcgccttctatcgccttcttgacgagttcttctgacatgaccaaaat
cccttaacgtgagttttcgttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatcctttttttc
tgcgcgtaatctgctgcttgcaaacaaaaaaaccaccgctaccagcggtggtttgtttgccggatcaagagctacc
aactctttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaaatactgtccttctagtgtagccgtagttagg
ccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgctctgctaatcctgttaccagtggctgctgccagtg
gcgataagtcgtgtcttaccgggttggactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggtcgggctgaacg
gggggttcgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacctacaccgaactgagataccacagcgtgagctat
gagaaagcgccacgcttcccgaagggagaaaggcggacaggtatccggtaagcggcagggtcggaacagg
agagcgcacgagggagcttccagggggaaacgcctggtatctttatagtcctgtcgggtttcgccacctctgactt
gagcgtcgatttttgtgatgctcgtcaggggggcggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggcctttttacggt
tcctggccttttgctggccttttgctcacatgttctttcctgcgttatcccctgattctgtggataaccgtattaccgcctttg
agtgagctgataccgctcgccgcagccgaacgaccgagcgcagcgagtcagtgagcgaggaagcggaaga
gcgcctgatgcggtattttctccttacgcatctgtgcggtatttcacaccgcatatggtgcactctcagtacaatctgct
ctgatgccgcatagttaagccagtatacactccgctatcgctacgtgactgggtcatggctgcgccccgacacccg
ccaacaccccgctgacgcgccctgacgggc

(SEQ ID NO:50)

Fig. 36

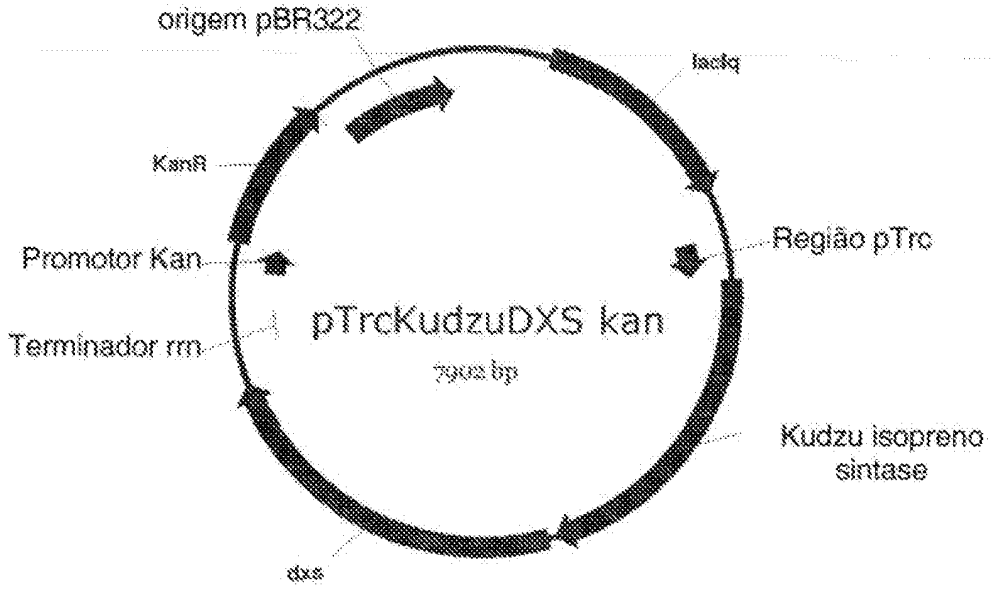

origem pBR322
lacIq
KanR
Promotor Kan
Terminador rrn
pTrcKudzuDXS kan
7902 bp
Região pTrc
Kudzu isopreno sintase
dxs

Fig. 37A

5'-
ttgtctgctcccggcatccgcttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcagaggttttcaccgtcat
caccgaaacgcgcgaggcagcagatcaattcgcgcgcgaaggcgaagcggcatgcatttacgttgacaccatcg
aatggtgcaaaacctttcgcggtatggcatgatagcgcccggaagagagtcaattcagggtggtgaatgtgaaacc
agtaacgttatacgatgtcgcagagtatgccggtgtctcttatcagaccgtttcccgcgtggtgaaccaggccagcca
cgtttctgcgaaaacgcgggaaaaagtggaagcggcgatggcggagctgaattacattcccaaccgcgtggcaca
acaactggcgggcaaacagtcgttgctgattggcgttgccacctccagtctggccctgcacgcgccgtcgcaaattgt
cgcggcgattaaatctcgccgccgatcaactgggtgccagcgtggtggtgtcgatggtagaacgaagcggcgtcgaa
gcctgtaaagcggcggtgcacaatcttctcgcgcaacgcgtcagtgggctgatcattaactatccgctggatgacca
ggatgccattgctgtggaagctgcctgcactaatgttccggcgttatttcttgatgtctctgaccagacacccatcaaca
gtattatttctcccatgaagacggtacgcgactgggcgtggagcatctggtcgcattgggtcaccagcaaatcgcgct
gttagcgggcccattaagttctgtctcggcgcgtctgcgtctggctggctggcataaatatctcactcgcaatcaaattc
agccgatagcggaacgggaaggcgactggagtgccatgtccggttttcaacaaaccatgcaaatgctgaatgagg
gcatcgttcccactgcgatgctggttgccaacgatcagatggcgctgggcgcaatgcgcgccattaccgagtccggg
ctgcgcgttggtgcggatatctcggtagtgggatacgacgataccgaagacagctcatgttatatcccgccgtcaacc
accatcaaacaggatttcgcctgctggggcaaaccagcgtggaccgcttgctgcaactctctcagggccaggcggt
gaagggcaatcagctgttgcccgtctcactggtgaaaagaaaaaccaccctggcgcccaatacgcaaaccgcctc
tccccgcgcgttggccgattcattaatgcagctggcacgacaggtttcccgactggaaagcgggcagtgagcgcaa
cgcaattaatgtgagttagcgcgaattgatctggtttgacagcttatcatcgactgcacggtgcaccaatgcttctggcgt
caggcagccatcggaagctgtggtatggctgtgcaggtcgtaaatcactgcataattcgtgtcgctcaaggcgcactc
ccgttctggataatgttttttgcgccgacatcataacggttctggcaaatattctgaaatgagctgttgacaattaatcatc
cggctcgtataatgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagcgccgctgagaaaaagcgaa
gcggcactgcttctttaacaatttatcagacaatctgtgtgggcactcgaccggaattatcgattaactttattattaaaaat
taaagaggtatatattaatgtatcgattaaataaggaggaaaaaaccatgtgtgcgacctcttctcaatttactcagatta
ccgagcataattcccgtcgttccgcaaactatcagccaaacctgtggaatttcgaattcctgcaatccctggagaacg
acctgaaagtggaaaagctggaggagaaagcgaccaaactggaggaagaagttcgctgcatgatcaaccgtgta
gacacccagccgctgtccctgctggagctgatcgacgatgtgcagcgcctgggtctgacctacaaatttgaaaaag
acatcattaaagccctggaaaaacatcgtactgctggacgaaaacaaaaagaacaaatctgacctgcacgcaaacc
gctctgtcttccgtctgctgcgtcagcacggtttcgaggtttctcaggatgttttgagcgtttcaaggataaagaaggtg
gtttcagcggtgaactgaaaggtgacgtccaaggcctgctgagcctgtatgaagcgtcttacctgggtttcgagggtg
agaacctgctggaggaggcgctaccttttccatcacccacctgaagaacaacctgaaagaaggcattaatacca
aggttgcagaacaagtgagccacgccctggaactgccatatcaccagcgtctgcaccgtctggaggcacgttggttc
ctggataaatacgaaccgaaagaaccgcatcaccagctgctgctggagctggcgaagctggatttaacatggtac
agaccctgcaccagaaagagctgcaagatctgtcccgctggtggaccgagatgggcctggctagcaaactggattt
tgtacgcgaccgcctgatggaagtttatttctgggcactgggtatggcgccagacccgcagttggtgaatgtcgcaaa
gctgttactaaaatgttggtctggtgacgatcatcgatgacgtgtatgacgtttatggcactctggacgaactgcaactg
ttcaccgatgctgtagagcgctgggacgttaacgct

Fig. 37B

attaacaccctgccggactatatgaaaactgtgtttcctggcactgtacaacaccgttaacgacacgtcctatttctattc
tgaaagagaaaggtcataacaacctgtcctatctgacgaaaagctggcgtgaactgtgcaaagcctttctgcaag
aggcgaaaatggtccaacaacaaaattatcccggcttttcttccaagtacctggaaaaacgccagcgtttcctccttcg
gtgtagcgctgctggcgccgtcttacttttccgtatgccagcagcaggaagacatctcgaccacgcgctgcgttcc
ctgaccgacttccatggtctgggtgcgttctagctgcgttatcttccgcctgtgcaacgatctggccacctctgcggcg
gagctggaacgtggcgagactaccaattctatcattagctacatgcacgaaaacgatggtaccagcgaggaac
aggcccgcgaagaactgcgtaaactgatcgacgccgaatggaaaaagatgaatcgtgaacgcgttagcgact
ccacccgctgcctaaagcgttcatggaaatcgcagttaacatggcacgtgtttcccactgcacctaccagtatgg
cgatggtctgggtcgcccagactacgcgactgaaaaccgcatcaaactgctgctgattgacccttcccgattaac
cagctgatgtatgtctaactgcattcgccttaggaggtaaaaaaaacatgagttttgatattgccaaatacccgacc
ctggcactggtcgactccacccaggagttacgactgttgccgaaagagagtttaccgaaactctgcgacgaactg
cgccgctatttactcgacagcgtgagccgttccagcgggcactgcctccgggctgggcacggtcgaactgacc
gtggcgctgcactatgtctacaacacccccgttgaccaattgatttgggatgtggggcatcaggcttatccgcataa
aatttgaccggacgccgcgacaaaatcggcaccatccgtcagaaaggcggtctgcaccccgttcccgtggcgc
ggcgaaagcgaatatgacgtattaagcgtcgggcattcatcaacctccatcagtgccggaattggtattgcggttg
ctgccgaaaaagaaggcaaaaatcgccgcaccgtctgtgtcattggcgatggcgcgattaccgcaggcatggc
gtttgaagcgatgaatcacgcgggcgatatccgtcctgatatgctggtgattctcaacgacaatgaaatgtcgattc
cgaaaatgtcggcgcgctcaacaaccatctggcacagctgctttcggtaagcttactcttcactgcgcgaaggc
gggaaaaaagttttctctggcgtgccgccaattaaagagctgctcaaacgcaccgaagaacatattaaaggcat
ggtagtgcctggcacgttgtttgaagagctgggcttaactacatcggcccggtggacggtcacgatgtgctgggg
cttatcaccacgctaaagaacatgcgcgacctgaaaggcccgcagttcctgcatatcatgaccaaaaaaggtcg
tggttatgaacccggcagaaaaagacccgatcactttccacgccgtgcctaaatttgatccctccagcggttgtttgc
ccgaaaagtagcggcggtttgccgagctattcaaaaatctttggcgactggtgtgcgaaacggcagcgaaagac
aacaagctgatggcgattactcccggcgatgcgtgaaggttccggcatggtcgagttttcacgtaaatttcccggatc
gctacttcgacgtggcaattgccgagcaacacgcggtgacctttgctgcgggtctggcgatggtgggtacaaac
ccattgtcgcgatttactccacttttctgcaacgcgcctatgatcaggtgctgcatgacgtggcgattcaaaagcttc
cggtcctgttcgccatcgaccgcgcgggcattgttggtgctgacggtcaaaacccatcagggtgcttttgatctctctta
cctgcgctgcataccggaaatggtcattatgacccccgagcgatgaaaacgaatgtcgccagatgctctataccgg
ctatcactataacgatggcccgtcagcggtgcgctacccgcgtggcaacgcggtcggcgtggaactgacgccg
ctggaaaaactaccaattggcaaaggcattgtgaagcgtcgtggcgagaaactggcgatccttaactttggtacg
ctgatgccagaagcggcgaaagtgccgaatcgctgaacgccacgctggtcgatatgcgttttgtgaaaccgctt
gatgaagcgttaattctggaaatggccgccagccatgaagcgctggtcaccgtagaagaaaacgccattatgggg
cggcgcaggcagcggcgtgaacgaagtgctgatggcccatcgtaaaccagtacccgtgctgaacattggcctg
ccggacttcttattccgcaaggaactcaggaagaaatgcgcgccgaactcggcctcgatgccgctggtatggaa
gccaaaatcaaggcctggctggcataactgcagctggtaccatatgggaattcgaagcttctagaacaaaaaact
catctcagaagaggatctgaatagcgccgtcgaccatcatcatcatcattgagtttaaacggtctccagcttgg
ctgttttggcggatgagagaagattttcagcctgatacagattaaatcagaacgcagaagcggtctgataaaaca
gaatttgcctggcggcagtagcgcg

Fig. 37C

gtggtcccacctgaccccatgccgaactcagaagtgaaacgccgtagcgccgatggtagtgtggggtctcc
ccatgcgagagtagggaactgccaggcatcaaataaaacgaaaggctcagtcgaaagactgggccttic
gttttatctgttgtttgtcggtgaacgctctcctgagtaggacaaatccgccgggagcggatttgaacgttgcga
agcaacggcccggagggtggcgggcaggacgcccgccataaactgccaggcatcaaattaagcagaa
ggccatcctgacggatggcctttttgcgtttctacaaactcttttgtttatttttctaaatacattcaaatatgtatccg
cttaaccggaattgccagctggggcgccctctggtaaggttgggaagccctgcaaagtaaactggatggctt
tctcgccgccaaggatctgatggcgcaggggatcaagctctgatcaagagacaggatgaggatcgtttcgc
atgattgaacaagatggattgcacgcaggttctccggccgcttgggtggagaggctattcggctatgactggg
cacaacagacaatcggctgctctgatgccgccgtgttccggctgtcagcgcaggggcgcccggttctttttgtc
aagaccgacctgtccggtgccctgaatgaactgcaagacgaggcagcgcggctatcgtggctggccacg
acgggcgttccttgcgcagctgtgctcgacgttgtcactgaagcgggaagggactggctgctattgggcgaa
gtgccggggcaggatctcctgtcatctcaccttgctcctgccgagaaagtatccatcatggctgatgcaatgc
ggcggctgcatacgcttgatccggctacctgcccattcgaccaccaagcgaaacatcgcatcgagcgagc
acgtactcggatggaagccggtcttgtcgatcaggatgatctggacgaagagcatcaggggctcgcgccag
ccgaactgttcgccaggctcaaggcgagcatgcccgacggcgaggatctcgtcgtgacccatggcgatgc
ctgcttgccgaatatcatggtggaaaatggccgcttttctggattcatcgactgtggccggctgggtgtggcgg
accgctatcaggacatagcgttggctacccgtgatattgctgaagagcttggcggcgaatgggctgaccgctt
cctcgtgctttacggtatcgccgctcccgattcgcagcgcatcgccttctatcgccttcttgacgagttcttctgac
gcatgaccaaaatcccttaacgtgagttttcgttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggat
cttcttgagatcctttttttctgcgcgtaatctgctgcttgcaaacaaaaaaaccaccgctaccagcggtggtttgt
ttgccggatcaagagctaccaactctttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaaatactg
tccttctagtgtagccgtagttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgctctgctaa
tcctgttaccagtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttggactcaagacgatagttaccg
gataaggcgcagcggtcgggctgaacgggggttcgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacctac
accgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcgccacgcttcccgaagggagaaaggcggac
caggtatccggtaagcggcagggtcggaacaggagagcgcacgagggagcttccagggggaaacgcc
tggtatcttatagtcctgtcgggtttcgccacctctgacttgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcaggggggcg
gagcctatggaaaaacgccagcaacgcggcctttttacggttcctggccttttgctggccttttgctcacatgttc
tttcctgcgttatcccctgattctgtggataaccgtattaccgcctttgagtgagctgataccgctcgccgcagcc
gaacgaccgagcgcagcgagtcagtgagcgaggaagcggaagagcgcctgatgcggtatttctccttac
gcatctgtgcggtatttcacaccgcatatggtgcactctcagtacaatctgctctgatgccgcatagttaagcca
gtatacactccgctatcgctacgtgactgggtcatggctgcgccccgacacccgccaacacccgctgacgc
gccctgacgggc

(SEQ ID NO:51)

Fig. 38

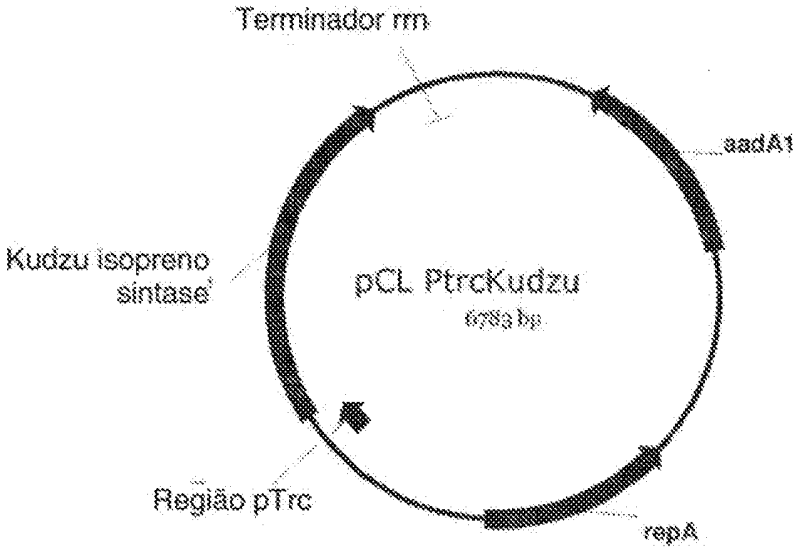

Terminador rrn
aadA1
Kudzu isopreno sintase
pCL PtrcKudzu
6783 bp
Região pTrc
repA

Fig. 39A

5'-
ctggcgtaatagcgaagaggcccgcaccgatcgccattcccaacagttgcgcagcctgaatggcgaatggcgcc
tgatgcggtatttctccttacgcatctgtgcggtatttcacaccgcatatggtgcactctcagtacaatctgctctgatgc
cgcatagttaagccagccccgacacccgccaacacccgctgacgagcttagtaaagccctcgctagatttaatgc
ggatgttgcgattacttcgccaactattgcgataacaagaaaaagccagcctttcatgatatatctcccaatttgtgtag
ggcttattatgcacgcttaaaaataataaaagcagacttgacctgatagtttggctgtgagcaattatgtgcttagtgca
tctaacgcttgagttaagccgcgccgcgaagcggcgtcggcttgaacgaattgttagacattattgccgactacctt
ggtgatctcgcctttcacgtagtggacaaatttcttccaactgatctgcgcgcgaggccaagcgatcttcttcttgtccaa
gataagcctgtctagcttcaagtatgacgggctgatactgggccggcaggcgctccattgcccagtcggcagcgac
atccttcggcgcgatttgccggttactgcgctgtaccaaatgcgggacaacgtaagcactacatttcgctcatcgcc
agcccagtcgggcggcgagttccatagcgttaaggtttcatttagcgcctcaaatagatcctgttcaggaaccggat
caaagagtttcctccgccgctggacctaccaaggcaacgctatgttctcttgctttgtcagcaagatagccagatcaa
tgtcgatcgtggctggctcgaagatacctgcaagaatgtcattgcgctgccattctccaaattgcagttcgcgcttagc
tggataacgccacggaatgatgtcgtcgtgcacaacaatggtgacttctacagcgcggagaatctcgctctctcca
ggggaagccgaagtttccaaaaggtcgttgatcaaagctcgccgcgttgtttcatcaagccttacggtcaccgtaac
cagcaaatcaatatcactgtgtggcttcaggccgccatccactgcggagccgtacaaatgtacggccagcaacgt
cggttcgagatggcgctcgatgacgccaactacctctgatagttgagtcgatacttcggcgatcaccgcttccctcat
gatgtttaacttgtttttagggcgactgccctgctgcgtaacatcgttgctgctccataacatcaaacatcgacccacgg
cgtaacgcgcttgctgcttggatgcccgaggcatagactgtaccccaaaaaaacagtcataacaagccatgaaa
accgccactgcgccgttaccaccgctgcgttcggtcaaggttctggaccagttgcgtgagcgcatacgctacttgca
ttacagcttacgaacccgaacaggcttatgtccactgggttcgtgccttcatccgtttccacggtgtgcgtcacccggca
accttgggcagcagcgaagtcgaggcatttctgtcctggctggcgaacgagcgcaaggtttcggtctccacgcatc
gtcaggcattggcggccttgctgttcttctacggcaaggtgctgtgcacggatctgcctggcttcaggagatcggaa
gacctcggccgtcgcggcgcttgccggtggtgctgaccccggatgaagtggttcgcatcctcggttttctggaaggc
gagcatcgtttgttcgcccagcttctgtatggaacgggcatgcggatcagtgagggtttgcaactgcgggtcaagga
tctggatttcgatcacggcacgatcatcgtgcgggagggcaagggctccaaggatcgggccttgatgttacccgag
agcttggcacccagcctgcgcgagcaggggaattaattcccacgggtttgctgcccgcaaacgggctgttctggtg
ttgctagtttgttatcagaatcgcagatccggcttcagccggtttgccggctgaaagcgctatttcttccagaattgccat
gattttttccccacgggaggcgtcactggctcccgtgttgtcggcagcttgatcgataagcagcatgcctgtttcag
gctgtctatgtgtgactgttgagctgtaacaagttgtctcaggtgttcaatttcatgttctagttgctttgttttactggtttcac
ctgttctattaggtgttacatgctgttcatctgttacattgtcgatctgttcatggtgaacagctttgaatgcaccaaaaact
cgtaaaagctctgatgtatctatcttttttacaccgtttcatctgtgcatatggacagttttcccttgatatgtaacggtga
acagttgttctacttttgtttgttagtcttgatgcttcactgatagatacaagagccataagaacctcagatccttccgtatt
tagccagtatgttctctagtgtggttcgttgttttgcgtgagccatgagaacgaaccattgagatcatacttactttgcat
gtcactcaaaaatttgcctcaaaactggtgagctgaatttttgcagttaaagcatcgtgtagtgttttcttagtccgttat
gtaggtaggaatctgatgtaatggttgttggtattttgtcaccattcattttatctggttgttctcaagttcgg

Fig. 39B

ttacgagatccatttgtctatctagttcaacttggaaaatcaacgtatcagtcgggcggcctcgcttatcaaccaccaatt
tcatattgctgtaagtgtttaaatctttacttattggtttcaaaacccattggttaagccttttaaactcatggtagttatttcaa
gcattaacatgaacttaaattcatcaaggctaatctctatattgccttgtgagtttttcttttgtgttagttctttttaataaccact
cataaatcctcatagaggtatttgtttttcaaaagacttaacatgttccagattatattttatgaatttttttaactggaaaagata
aggcaatatctctttcactaaaaactaatttctaatttttcgcttgagaacttggcatagtttgtccactggaaaatctcaaag
cctttaaccaaaggattcctgatttccacagttctcgtcatcagctctctggttgctttagctaatacaccataagcatttttcc
ctactgatgttcatcatctgagcgtattggttataagtgaacgataccgtccgttctttccttgtagggttttcaatcgtgggg
ttgagtagtgccacacagcataaaattagcttggtttcatgctccgttaagtcatagcgactaatcgctagttcatttgcttt
gaaaacaactaatttcagacatacatctcaattggtctaggtgattttaatcactataccaattgagatgggctagtcaat
gataattactagtccttttcctttgagttgtgggtatctgtaaattctgctagaccttgctggaaaacttgtaaattctgctag
accctctgtaaattccgctagaccttgtgtgttttttttgtttatattcaagtggttataatttatagaataaagaaagaataa
aaaaagataaaaaagaatagatcccagccctgtgtataactcactacttagtcagttccgcagtattacaaaaggatg
tcgcaaacgctgttgctcctctacaaaacagaccttaaaaccctaaaggcttaagtagcaccctcgcaagctcgggg
caaatcgctgaatattccttttgtctccgaccatcaggcaccctgagtcgctgtctttttcgtgacattcagttcgctgcgctc
acggctctggcagtgaatgggggtaaatggcactacaggcgccttttatggattcatgcaaggaaactacccataat
acaagaaaagcccgtcacgggcttctcagggcgtttatggcgggtctgctatgtggtgctatctgactttttgctgttcag
cagttcctgccctctgattttccagtctgaccacttcggattatcccgtgacaggtcattcagactggctaatgcacccag
taaggcagcggtatcatcaacaggcttacccgtcttactgtcgggaattcgcgttggccgatttcattaatgcagattctg
aaatgagctgttgacaattaatcatccggctcgtataatgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaaac
agcgccgctgagaaaaagcgaagcggcactgctctttaacaatttatcagacaatctgtgtgggcactcgaccgga
attatcgattaactttattattaaaaattaaagaggtatatattaatgtatcgattaaataaggaggaataaaccatgtgtg
cgaccictttctcaatttactcagattaccgagcataattcccgtcgttccgcaaactatcagccaaacctgtggaatttcg
aattcctgcaatccctggagaacgacctgaaagtggaaaagctggaggagaaagcgaccaaactggaggaaaga
agttcgctgcatgatcaaccgtgtagacacccagccgctgtccctgctggagctgatcgacgatgtgcagcgcctgg
gtctgacctacaaatttgaaaaagacatcattaaagccctggaaaacatcgtactgctggacgaaaacaaaaaga
acaaatctgacctgcacgcaaccgctctgtctttccgtctgctgcgtcagcacggtttcgaggtttctcaggatgttttga
gcgtttcaaggataaagaaggtggtttcagcgglgaactgaaaggtgacgtccaaggccigctgagccigtatgaag
cgtcttacctgggtttcgagggtgagaacctgctggaggaggcgcgtaccttttccatcacccacctgaagaacaacc
tgaaagaaggcattaataccaaggttgcagaacaagtgagccacgcccggaactgccatatcaccagcgtctgc
accgtctggaggcacgttggttcctggataaatacgaaccgaaagaaccgcatcaccagctgctgctggagctggc
gaagctggatttaacatggtacagaccctgcaccagaaagagctgcaagatctgtcccgctggtggacgagatg
ggcctggctagcaaactggatttttgtacgcgaccgcctgatggaagtttatttctgggcactgggtatggcgccagacc
ccgcagttggtgaatgtcgcaaagctgttactaaaatgttggtctggtgacgatcatcgatgacgtgtatgacgtttatg
gcactctggacgaactgcaactgttcaccgatgctgtagagcgctgggacgttaacgctattaacaccctgccggact
atatgaaactgtgtttcctggcactgtacaacaccgttaacgacacgtcctatictatttctgaaagagaaaggtcataac
aaccigtcct

Fig. 39C

atctgacgaaaagctggcgtgaactgtgcaaagcctttctgcaagaggcgaaaatggtccaacaacaaaatta
tcccggctttctccaagtacctggaaaacgccagcgtttcctcctccggtgtagcgctgctggcgccgtcttactt
tccgtatgccagcagcaggaagacatctccgaccacgcgctgcgttccctgaccgacttccatggtctggtgc
gttctagctgcgttatcttccgcctgtgcaacgatctggccacctctgcggcggagctggaacgtggcgagact
accaattctatcattagctacatgcacgaaaacgatggtaccagcgaggaacaggcccgcgaagaactgcg
taaactgatcgacgccgaatggaaaaagatgaatcgtgaacgcgttagcgactccaccctgctgcctaaagc
gttcatggaaatcgcagttaacatggcacgtgtttcccactgcacctaccagtatggcgatggtctgggtcgccc
agactacgcgactgaaaaccgcatcaaactgctgttgattgacccttttccgattaaccagctgatgtatgtcta
actgcagctggtaccatatgggaattcgaagctttctagaacaaaaaactcatctcagaagaggatctgaatag
cgccgtcgaccatcatcatcatcattgagtttaaacggtctccagcttggctgttttggcggatgagagaag
attttcagcctgatacagattaaatcagaacgcagaagcggtctgataaaacagaatttgcctggcggcagta
gcgcggtggtcccacctgaccccatgccgaactcagaagtgaaacgccgtagcgccgatggtagtgtgggg
tctccccatgcgagagtagggaactgccaggcatcaaataaaacgaaaggctcagtcgaaagactgggcct
ttcgttttatctgttgtttgtcggtgaacgctctcctgagtaggacaaatccgccgggagcggatttgaacgttgcg
aagcaacggcccggagggtggcgggcaggacgcccgccataaactgccaggcatcaaattaagcagaa
ggccatcctgacggatggcctttttgcgtttctacaaactctttttgtttatttttctaaatacattcaaatatgtatccgc
tcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataat

(SEQ ID NO:52)

Fig. 40

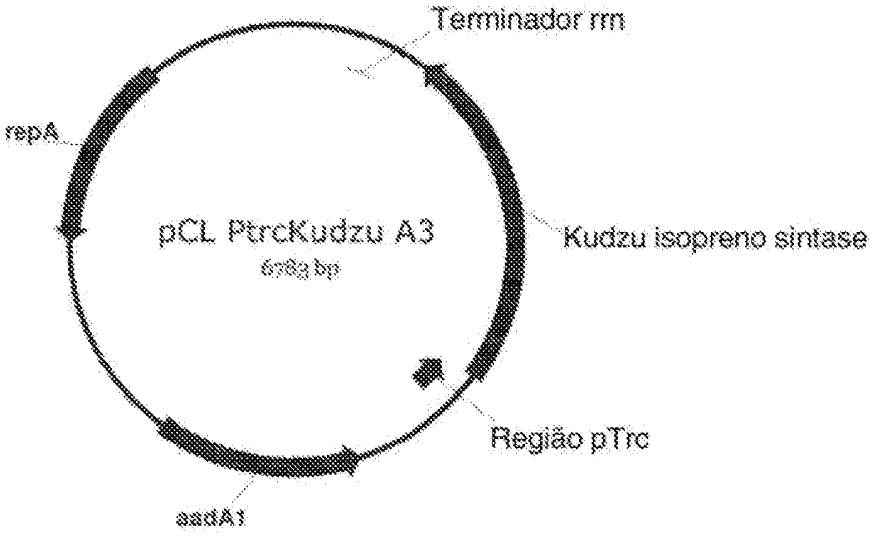

Terminador rrn
repA
pCL PtrcKudzu A3
6788 bp
Kudzu isopreno sintase
Região pTrc
aadA1

Fig. 41A

5'-

ccogtcttactgtcgggaattcgcgttggccgattcattaatgcagattattgaagcatttatcagggttattgtctcatg
agcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataaacaaaaagagtttgtagaaacgcaaaaaggccatccgtca
ggatggccttctgcttaatttgatgcctggcagtttatggcgggcgtcctgcccgccaccctccgggccgttgcttcg
caacgttcaaatccgctcccggcggatttgtcctactcaggagagcgttcaccgacaaacaacagataaaacga
aaggcccagtctttcgactgagcctttcgttttatttgatgcctggcagttccctactctcgcatggggagaccccaca
ctaccatcggcgctacggcgtttcactttctgagttcggcatgggtcaggtgggaccaccgcgctactgccgccca
ggcaaatctgtttatcagaccgcttctgcgttctgatttaatctgtatcaggctgaaaatcttctctcatccgccaaaa
cagccaagctggagaccgtttaaactcaatgatgatgatgatgatggtcgacggcgctattcagatcctcttctgag
atgagttttgttctagaaagcttcgaattcccatatggtaccagctgcagttagacatacatcagctggttaatcggg
aaagggtcaatcagcagcagttgatgcggtttcagtcgcgtagtctgggcgacccagaccatcgccatactggt
aggtgcagtgggaaacacgtgccatgttaactgcgatttccatgaacgctttaggcagcagggtggagtcgctaa
cgcgttcacgattcatcttttccattcggcgtcgatcagtttacgcagttcttcgcgggcctgttcctcgctggtaccat
cgttttcgtgcatgtagctaatgatagaattggtagtctcgccacgttccagctccgccgcagaggtggccagatcg
ttgcacaggcggaagataacgcagctagaacgcaccagaccatggaagtcggtcagggaacgcagcgcgtg
gtcggagatgtcttcctgctgctggcatacggaaaagtaagacggcgccagcagcgctacaccggaggagga
aacgctggcgtttccaggtacttggagaaagccgggataatttgttgttggaccatttcgcctcttgcagaaaggct
ttgcacagttcacgccagctttttcgtcagataggacaggttgttatgaccttctctttcagaatagaataggacgtgtc
gttaacggtgttgtacagtgccaggaaacacagtttcatatagtccggcagggtgttaatagcgttaacgtcccagc
gctctacagcatcggtgaacagttgcagttcgtccagagtgccataaacgtcatacacgtcatcgatgatcgtcac
cagaccaaacatttagtaacagctttgcgacattcaccaaactgcgggtctggcgccatacccagtgcccagaaa
ataaacttccatcaggcggtcgcgtacaaaatccagttgctagccaggcccatctcggtccaccagcgggaca
gatcttgcagctctttctggtgcagggtctgtaccatgttaaaatccagctcgccagctccagcagcagctggtgat
gcggttcttcggttcgtatttatccaggaaccaacgtgcctccagacggtgcagacgctggtgatatggcagttcc
agggcgtggctcacttgttctgcaaccttggtattaatgccttcttcaggttgttctcaggtgggtgatggaaaaggt
acgcgcctcctccagcaggttctcaccctcgaaacccaggtaagacgcttcatacaggctcagcaggccttgga
cgtcaccttcagttcacgctgaaaccacttctttatccttgaaacgctcaaaaacatcctgagaaacctcgaaa
ccgtgctgacgcagcagacggaaagacagagcggttgcgtgcaggtcagatttgttcttttgttttcgtccagcagt
acgatgttttccagggcttaatgatgtcttttcaaatttgtaggtcagacccaggcgctgcacatcgtcgatcagctc
cagcagggacagcggctgggtgtctacacggttgatcatgcagcgaacttcttcctccagtttggtcgctttctcctc
cagctttccacttcaggtcgttctccagggattgcaggaattcgaaattccacaggtttggctgatagtttgcggaa
cgacgggaattatgctcggtaaatctgagtaaaattgagaagaggtcgcacacatggtttatttcctccttattaatcgat
acattaatatatacctcttaatttttaataataaagttaatcgataattcoggtcgagtgcccacacagattgtctgata
aattgttaaagagcagtgccgcttcgcttttttctcagcggcgctgtttcctgtgtgaaattgttatccgctcacaattcca
cacattatacgagccggatgattaattgtcaacagctcatttcagaatctggcgtaatagcgaagaggcccgcac
cgatcgccctcccaacagttgcgcagcctgaatggcgaatggcgcctgatgcggtattttctccttacgcatctgtg
cggtatttcacaccgcatatggtgcactctcagtacaatctgctc

Fig. 41B

tgatgccgcatagttaagccagccccgacacccgccaacacccgctgacgagcttagtaaagccctcgctagat
ttaatgcggatgttgcgattacttcgccaactattgcgataacaagaaaaagccagcctttcatgatatatctccca
atttgtgtagggcttattatgcacgcttaaaaataataaaagcagacttgacctgatagtttggctgtgagcaattatg
tgcttagtgcatctaacgcttgagttaagccgcgccgcgaagcggcgtcggcttgaacgaattgttagacattattg
ccgactaccttggtgatctcgcctttcacgtagtggacaaattcttccaactgatctgcgcgcgaggccaagcgatc
ttcttcttgtccaagataagcctgtctagcttcaagtatgacgggctgatactgggccggcaggcgctccattgccca
gtcggcagcgacatccttcggcgcgatttgccggttactgcgctgtaccaaatgcgggacaacgtaagcactac
atttcgctcatcgccagcccagtcgggcggcgagttccatagcgttaaggtttcatttagcgcctcaaatagatcctg
ttcaggaaccggatcaaagagttcctccgccgctggacctaccaaggcaacgctatgttctcttgctttttgtcagca
agatagccagatcaatgtcgatcgtggctggctcgaagatacctgcaagaatgtcattgcgctgccattctccaaa
ttgcagttcgcgcttagctggataacgccacggaatgatgtcgtcgtgcacaacaatggtgacttctacagcgcgg
agaatctcgctctctccagggaagccgaagtttccaaaaggtcgttgatcaaagctcgccgcgttgtttcatcaa
gccttacggtcaccgtaaccagcaaatcaatatcactgtgtggcttcaggccgccatccactgcggagccgtaca
aatgtacggccagcaacgtcggttcgagatggcgctcgatgacgccaactacctctgatagttgagtcgatacttc
ggcgatcaccgcttccctcatgatgtttaactttgttttagggcgactgccctgctgcgtaacatcgttgctgctccata
acatcaaacatcgacccacggcgtaacgcgcttgctgcttggatgcccgaggcatagactgtaccccaaaaaa
acagtcataacaagccatgaaaaccgccactgcgccgttaccaccgctgcgttcggtcaaggttctggaccagtt
gcgtgagcgcatacgctacttgcattacagcttacgaaccgaacaggcttatgtccactgggttcgtgccttcatcc
gtttccacggtgtgcgtcacccggcaaccttgggcagcagcgaagtcgaggcatttctgtcctggctggcgaacg
agcgcaaggtttcggtctccacgcatcgtcaggcattggcggccttgctgttcttctacggcaaggtgctgtgcacg
gatctgccctggcttcaggagatcggaagacctcggccgtcgcggcgcttgccggtggtgctgaccccggatga
agtggttcgcatcctcggttttctggaaggcgagcatcgtttgttcgcccagcttctgtatggaacgggcatgcggat
cagtgagggtttgcaactgcgggtcaaggatctggatttcgatcacggcacgatcatcgtgcgggagggcaagg
gctccaaggatcgggccttgatgttacccgagagcttggcacccagcctgcgcgagcaggggaattaattccca
cgggttttgctgcccgcaaacgggctgttctggtgttgctagtttgttatcagaatcgcagatccggcttcagccggttt
gccggctgaaagcgctatttcttccagaattgccatgattttttccccacgggaggcgtcactggctcccgtgttgtcg
gcagctttgattcgataagcagcatcgcctgtttcaggctgtctatgttgtgactgttgagctgtaacaagttgtctcagg
tgttcaatttcatgttctagttgctttgttttactggtttcacctgttctattaggtgttacatgctgttcatctgttacattgtcga
tctgttcatggtgaacagctttgaatgcaccaaaaactcgtaaaagctctgatgtatctatctttttttacaccgtttcatc
tgtgcatatggacagttttccctttgatatgtaacggtgaacagttgttctacttttgtttgttagtcttgatgcttcactgata
gatacaagagccataagaacctcagatccttccgtatttagccagtatgttctctagtgtggttcgttgttttttgcgtga
gccatgagaacgaaccattgagatcatacttactttgcatgtcactcaaaaatttgcctcaaaactggtgagctga
attttttgcagttaaagcatcgtgtagtgttttcttagtccgttatgtaggtaggaatctgatgtaatggttgttggtatttgt
caccattcatttttatctggttgttctcaagttcggttacgagatccatttgtctatctagttcaacttggaaaatcaacgta
tcagtcgggcggcctcgcttatcaaccaccaatttcatattgctgtaagtgtttaaatctttacttatggtttcaaaacc
catggttaagcctttaaactcatggtagttatttttcaagcattaacatgaacttaaattcatcaaggctaatctctatat
ttgc

Fig. 41C

cttgtgagtttctttgtgttagttctttaataaccactcataaatcctcatagagtatttgtttttcaaaagacttaacatgttc
cagattatatttatgaatttttttaactggaaaagataaggcaatatctcttcactaaaaaactaatttctaatttttcgcttga
gaactggcatagtttgtccactggaaaatctcaaagcctttaaccaaaggattcctgatttccacagttctcgtcatca
gctctctggttgctttagctaatacaccataagcattttccctactgatgttcatcatctgagcgtattggttataagtgaac
gataccgtccgttctttccttgtagggtttcaatcgtggggttgagtagtgccacacagcataaaattagcttggtttcat
gctccgttaagtcatagcgactaatcgctagttcatttgctttgaaaacaactaatttcagacatacatctcaattggtcta
ggtgattttaatcactataccaattgagatgggctagtcaatgataattactagtccttttccttgagttgtgggtatctgt
aaatttctgctagaccttgctggaaaacttgtaaatttctgctagacccttctgtaaatttccgctagaccttgtgtgttttttt
gtttatatttcaagtggttataatttatagaataaagaaagaataaaaaaagataaaaagaatagatcccagccctgt
gtataactcactacttagtcagttccgcagtattacaaaaggatgtcgcaaacgctgttgctcctctacaaaacaga
ccttaaaaccctaaaggcttaagtagcaccctcgcaagctcgggcaaatcgctgaatatttcctttgtctccgaccat
caggcacctgagtcgctgtcttttttcgtgacattcagttcgctgcgctcacggctctggcagtgaatgggggtaaatgg
cactacaggcgcctttttatggattcatgcaaggaaactacccataatacaagaaaagcccgtcacgggcttctcag
ggcgtttttatggcgggtctgctatgtggtgctatctgactttttgctgttcagcagttcctgccctctgattttccagtctgac
cacttcggattatcccgtgacaggtcattcagactggctaatgcacccagtaaggcagcggtatcatcaacaggctt
a

(SEQ ID NO:53)

Fig. 42

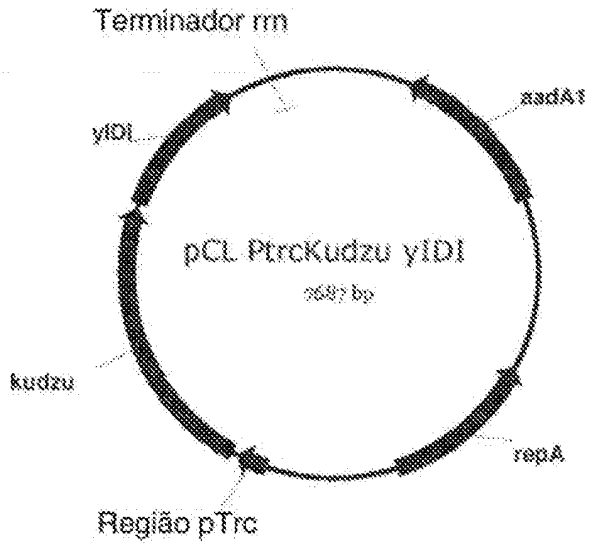

Terminador rrn
xadA1
yIDI
pCL PtrcKudzu yIDI
kudzu
repA
Região pTrc

Fig. 43A

5'-

ctggcgtaatagcgaagaggcccgcaccgatcgccctcccaacagttgcgcagcctgaatggcgaatggcg
cctgatgcggtatttctccttacgcatctgtgcggtatttcacaccgcatatggtgcactctcagtacaatctgctctg
atgccgcatagttaagccagccccgacacccgccaacacccgctgacgagcttagtaaagccctcgctagatt
ttaatgcggatgttgcgattacttcgccaactattgcgataacaagaaaaagccagcctttcatgatatatctccca
atttgtgtagggcttattatgcacgcttaaaaataataaaagcagacttgacctgatagtttggctgtgagcaattat
gtgcttagtgcatctaacgcttgagttaagccgcgccgcgaagcggcgtcggcttgaacgaattgttagacattat
ttgccgactaccttggtgatctcgcctttcacgtagtggacaaattcttccaactgatctgcgcgcgaggccaagc
gatcttcttcttgtccaagataagcctgtctagcttcaagtatgacgggctgatactgggccggcaggcgctccatt
gcccagtcggcagcgacatccttcggcgcgatttgccggttactgcgctgtaccaaatgcgggacaacgtaag
cactacatttcgctcatcgccagcccagtcgggcggcgagttccatagcgttaaggtttcatttagcgcctcaaat
agatcctgttcaggaaccggatcaaagagttcctccgccgctggacctaccaaggcaacgctatgttctcttgctt
ttgtcagcaagatagccagatcaatgtcgatcgtggctggctcgaagatacctgcaagaatgtcattgcgctgcc
attctccaaattgcagttcgcgcttagctggataacgccacggaatgatgtcgtcgtgcacaacaatggtgacttc
tacagcgcggagaatctcgctctctccaggggaagccgaagtttccaaaaggtcgttgatcaaagctcgccgc
gttgtttcatcaagccttacggtcaccgtaaccagcaaatcaatatcactgtgtggcttcaggccgccatccactg
cggagccgtacaaatgtacggccagcaacgtcggttcgagatggcgctcgatgacgccaactacctctgatag
ttgagtcgatacttcggcgatcaccgcttccctcatgatgtttaactttgttttagggcgactgccctgctgcgtaacat
cgttgctgctccataacatcaaacatcgacccacggcgtaacgcgcttgctgcttggatgcccgaggcatagac
tgtaccccaaaaaaacagtcataacaagccatgaaaaccgccactgcgccgttaccaccgctgcgttcggtca
aggttctggaccagttgcgtgagcgcatacgctacttgcattacagcttacgaaccgaacaggcttatgtccactg
ggttcgtgccttcatccgtttccacggtgtgcgtcacccggcaaccttgggcagcagcgaagtcgaggcatttctg
tcctggctggcgaacgagcgcaaggtttcggtctccacgcatcgtcaggcattggcggccttgctgttcttctacg
gcaaggtgctgtgcacggatctgccctggcttcaggagatcggaagacctcggccgtcgcggcgcttgccggt
ggtgctgaccccggatgaagtggttcgcatcctcggtttctggaaggcgagcatcgtttgttcgcccagcttctgta
tggaacgggcatgcggatcagtgagggtttgcaactgcgggtcaaggatctggatttcgatcacggcacgatca
tcgtgcgggagggcaagggctccaaggatcgggccttgatgttacccgagagcttggcacccagcctgcgcg
agcagggggaatttaatcccacgggttttgctgcccgcaaacgggctgttctggtgttgctagtttgttatcagaatcg
cagatccggcttcagccggttgcccggctgaaagcgctatttcttccagaattgccatgattttttccccacgggag
gcgtcactggctcccgtgttgtcggcagcttgatttcgataagcagcatcgcctgtttcaggctgtctatgtgtgact
gttgagctgtaacaagttgtctcaggtgttcaatttcatgttctagttgctttgtttactggtttcacctgttctattaggtgt
tacatgctgttcatctgttacattgtcgatctgttcatggtgaacagctttgaatgcaccaaaaaactcgtaaaagctct
gatgtatctatcttttttacaccgtttcatctgtgcatatggacagttttcccttgatatgtaacggtgaacagttgttct
actttgttgttagtcttgatgcttcactgatagatacaagagccataagaacctcagatccttccgtatttagccagt
atgttctctagtgtggttcgttgttttgcgtgagccatgagaacgaaccattgagatcatacttactttgcatgtcactc
aaaaatttgcctcaaaactggtgagctgaatttttgcagttaaagcatcgtgtagtgttttcttagtccgttatgtagg
taggaatctgatgtaatggttgttggtattttgtcaccattcattttatctggttgttctcaagttcgg

Fig. 43B

ttacgagatccattgtctatctagttcaacttggaaaatcaacgtatcagtcgggcggcctcgcttatcaaccacc
aatttcatattgctgtaagtgtttaaatctttacttattggtttcaaaacccattggttaagccttttaaactcatggtagtt
attttcaagcattaacatgaacttaaattcatcaaggctaatctctatatttgccttgtgagttttcttttgtgttagttctttt
aataaccactcataaatcctcatagagtatttgtttttcaaaagacttaacatgttccagattatattttatgaatttttttta
actggaaaagataaggcaatatctctttcactaaaaactaattctaatttttcgcttgagaacttggcatagtttgtcc
actggaaaatctcaaagcctttaaccaaaggattcctgatttccacagttctcgtcatcagctctctggttgctttagc
taatacaccataagcatttttccctactgatgttcatcatctgagcgtattggttataagtgaacgataccgtccgttctt
tccttgtagggtttcaatcgtggggttgagtagtgccacacagcataaaattagcttggtttcatgctccgttaagtc
atagcgactaatcgctagttcatttgctttgaaaacaactaattcagacatacatctcaattggtctaggtgattttaa
tcactataccaattgagatgggctagtcaatgataattactagtccttttccttgagttgtgggtatctgtaaattctgc
tagaccttgctggaaaacttgtaaattctgctagaccctctgtaaattccgctagaccttgtgtgttttttttgtttatatt
caagtggttataatttatagaataaagaaagaataaaaaaagataaaaagaatagatcccagccctgtgtata
actcactactttagtcagttccgcagtattacaaaaggatgtcgcaaacgctgtttgctcctctacaaaacagacct
taaaaccctaaaggcttaagtagcaccctcgcaagctcgggcaaatcgctgaatattccttttgtctccgaccatc
aggcacctgagtcgctgtcttttttcgtgacattcagttcgctgcgctcacggctctggcagtgaatgggggtaaatg
gcactacaggcgcctttatggattcatgcaaggaaactacccataatacaagaaaagcccgtcacgggcttct
cagggcgtttatggcgggtctgctatgtggtgctatctgactttttgctgttcagcagttcctgccctctgattttccagt
ctgaccacttcggattatcccgtgacaggtcattcagactggctaatgcacccagtaaggcagcggtatcatcaa
caggcttacccgtcttactgtcgggaattcgcgttggccgatttcattaatgcagattctgaaatgagctgttgacaat
taatcatcggctcgtataatgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagcgccgctgaga
aaaagcgaagcggcactgctctttaacaatttatcagacaatctgtgtgggcactcgaccggaattatcgattaa
ctttattattaaaaattaaagaggtatatattaatgtatcgattaaataaggaggaataaaccatgtgtgcgacctct
tctcaatttactcagattaccgagcataattcccgtcgttccgcaaactatcagccaaacctgtggaatttcgaattc
ctgcaatccctggagaacgacctgaaagtggaaaagctggaggagaaagcgaccaaactggaggaagaaa
gttcgctgcatgatcaaccgtgtagacacccagccgctgtccctgctggagctgatcgacgatgtgcagcgcct
gggtctgacctacaaatttgaaaaagacatcattaaagccctggaaaacatcgtactgctggacgaaaacaaa
aagaacaaatctgacctgcacgcaaccgctctgtctttccgtctgctgcgtcagcacggttcgaggttctcagg
atgttttgagcgtttcaaggataaagaaggtggttcagcggtgaactgaaaggtgacgtccaaggcctgctga
gcctgtatgaagcgtctacctgggttcgagggtgagaacctgctggaggaggcgctacctttccatcaccca
cctgaagaacaacctgaaagaaggcattaataccaaggttgcagaacaagtgagccacgccctggaactgc
catatcaccagcgtctgcaccgtctggaggcacgttggttcctggataaatacgaaccgaaagaaccgcatca
ccagctgctgctggagctggcgaagctggatttaacatggtacagaccctgcaccagaaagagctgcaagat
ctgtcccgctggtggaccgagatgggcctggctagcaaactggattttgtacgcgaccgcctgatggaagtttatt
tctgggcactgggtatggcgccagaccgcagtttggtgaatgtcgcaaagctgttactaaaatgtttggtctggtg
acgatcatcgatgacgtgtatgacgtttatggcactctggacgaactgcaactgttcaccgatgctgtagagcgct
gggacgttaacgctattaacaccctgccggactatatgaaactgtgtttcctggcactgtacaacaccgttaacga
cacgtcctattctattctgaaagagaaaggtcataacaacctgtcct

Fig. 43C

atctgacgaaaagctggcgtgaactgtgcaaagccttctgcaagaggcgaaatggtccaacaacaaaatt
atcccggctttctccaagtacctggaaaacgccagcgtttcctcctcggtgtagcgctgctggcgccgtctta
ctttccgtatgccagcagcaggaagacatctccgaccacgcgctgcgttcctgaccgacttccatggtctg
gtgcgttctagctgcgttatcttccgcctgtgcaacgatctggccacctctgcggcggagctggaacgtggcg
agactaccaattctatcattagctacatgcacgaaaacgatggtaccagcgaggaacaggcccgcgaaaga
actgcgtaaactgatcgacgccgaatggaaaaagatgaatcgtgaacgcgttagcgactccaccctgctgc
ctaaagcgttcatggaaatcgcagttaacatggcacgtgtttcccactgcacctaccagtatggcgatggtctg
ggtcgcccagactacgcgactgaaaaccgcatcaaactgctgctgattgacccttttccgattaaccagctg
atgtatgtctaactgcatcgcccttaggagctaaaaaaaaaatgactgccgacaacaatagtatgccccatggt
tgcagtatctagttacgccaaattagtgcaaaaccaaacacctgaagacattttggaagagtttcctgaaatta
ttccattacaacaaagacctaataccgatctagtgagacgtcaaatgacgaaagcggagaaacatgttttt
ctggtcatgatgaggagcaaattaagttaatgaatgaaaattgtattgttttggattgggacgataatgctattggg
tgccggtaccaagaaagtttgtcatttaatggaaaatattgaaaagggtttactacatcgtgcattctccgtctttta
ttttcaatgaacaaggtgaattactttacaacaaagagccactgaaaaaataacttttccctgatcttggacta
acacatgctgctctcatccactatgtattgatgacgaattaggtttgaagggtaagctagacgataagattaag
ggcgctattactgcggcggtgagaaaactagatcatgaattaggtattccagaagatgaaactaagacaag
gggtaagtttcacttttaaacagaatccattacatggcaccaagcaatgaaccatgggggtgaacatgaaatt
gattacatcctatttataagatcaacgctaaagaaaacttgactgtcaacccaaacgtcaatgaagttagag
acttcaaatgggtttcaccaaatgatttgaaaactatgtttgctgacccaagttacaagtttacgccttggtttaag
attatttgcgagaattacttattcaactggtgggagcaattagatgacctttctgaagtggaaaatgacaggca
aattcatagaatgctataacgacgcgtcctgcagctggtaccatatgggaattcgaagctttctagaacgaaa
actcatctcagaagaggatctgaatagcgccgtcgaccatcatcatcatcattgagtttaaacggtctcca
gcttggctgttttggcggatgagagaagattttcagcctgatacagattaaatcagaacgcagaagcggtctg
ataaaacagaatttgcctggcggcagtagcgcggtggtcccacctgaccccatgccgaactcagaagtga
aacgccgtagcgccgatggtagtgtggggtctccccatgcgagagtagggaactgccaggcatcaaataa
aacgaaaggctcagtcgaaagactgggccttcgttttatctgttgtttgtcggtgaacgctctcctgagtagga
caaatccgccgggagcggatttgaacgttgcgaagcaacggcccggagggtggcgggcaggacgcccg
ccataaactgccaggcatcaaattaagcagaaggccatcctgacggatggcctttttgcgtttctacaaactct
tttgtttatttttctaaatacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataat

(SEQ ID NO:54)

Fig. 44

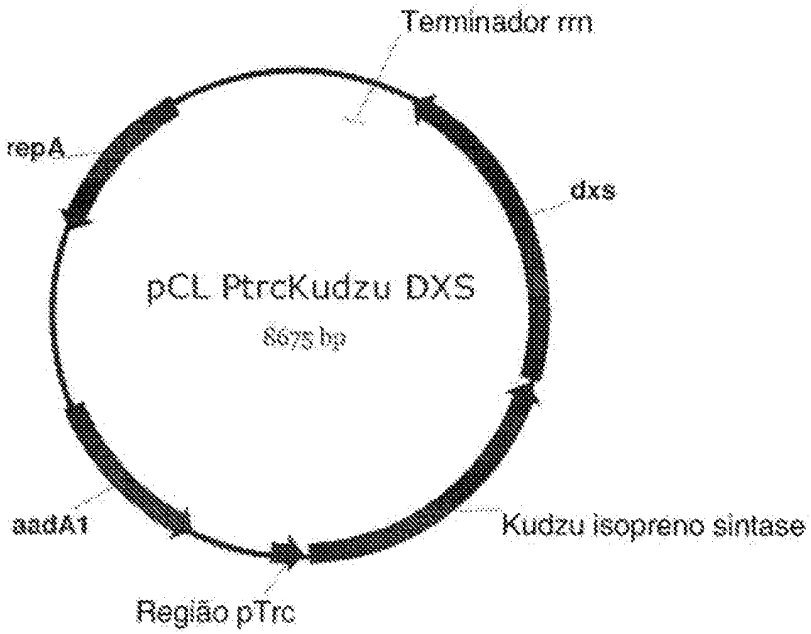

Terminador rrn
repA
dxs
pCL PtrcKudzu DXS
8675 bp
aadA1
Kudzu isopreno sintase
Região pTrc

Fig. 45A

5'-

ccegtcttactgtcgggaattcgcgttggccgattcattaatgcagattattgaagcatttatcagggttattgtctcatg
agcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataaacaaaaagagtttgtagaaacgcaaaaaggccatccgtca
ggatggccttctgcttaatttgatgcctggcagtttatggcgggcgtcctgcccgccaccctccgggccgttgcttcg
caacgttcaaatccgctcccggcggatttgtcctactcaggagagcgttcaccgacaaacaacagataaaacga
aaggcccagtctttcgactgagcctttcgttttatttgatgcctggcagttccctactctcgcatggggagaccccaca
ctaccatcggcgctacggcgtttcacttctgagttcggcatggggtcaggtgggaccaccgcgctactgccgcca
ggcaaattctgttttatcagaccgcttctgcgttctgatttaatctgtatcaggctgaaaatcttctctcatccgccaaaa
cagccaagctggagaccgtttaaactcaatgatgatgatgatgatggtcgacggcgctatcgagatcctctctgag
atgagttttgttctagaaagcttcgaattcccataiggtaccagctgcagttatgccagccaggccttgattttggcttc
cataccagcggcatcgaggccgagttcggcgcgcatttcttcctgagttcctgcggaataaagaagtccggcag
gccaatgttcagcacgggtactggtttacgatgggccatcagcacttcgttcacgccgctgcctgcgccgcccata
atggcgttttcttctacggtgaccagcgcttcatggctggcggccatttccagaatttaacgcttcatcaagcggtttca
caaaacgcatatcgaccagcgtggcgttcagcgattcggcgactttcgccgcttctggcatcagcgtaccaaaagtt
aaggatcgccagtttctgccacgacgcttcacaatgccttgccaatggtagtttttccagcggcgtcagttccac
gccgaccgcgttgccacgcgggtagcgcaccgctgacgggccatcgttatagtgatagccggtatagagcatct
ggcgacattcgttttcatcgctcgggtcataatgaccatttcggtatgcagcgcaggtaagagagatcaaaagc
accctgatgggtttgaccgtcagcaccaacaatgcccgcgcggtcgatggcgaacaggaccggaagctttgaa
tcgccacgtcatgcagcacctgatcataggcgcgttgcaggaaagtggagtaaatcgcgacaatgggtttgtacc
caccaatcgccagacccgcagcaaaggtcaccgcgtgttgctcggcaattgccacgtcgaagtagcgatccgg
gaatttacgtgaaaactcgaccatgccggaaccttcacgcatcgccggagtaatcgccatcagcttgttgtctttcg
ctgccgtttcgcacaaccagtcgccaaagatttttgaatagctcggcaaaccgccgctacttttcggcaaacaacc
gctggagggatcaaatttaggcacggcgtggaaagtgatcgggtcttttctgccggttcataaccacgacctttttg
gtcatgatatgcaggaactgcgggccttcaggtcgcgcatgttcttagcgtggtgataagccccagcacatcgtg
accgtccaccgggccgatgtagttaaagcccagctcttcaaacaacgtgccaggcactaccatgccttaaatagt
tcttcggtgcgtttgagcagctctttaattggcggcacgccagagaaaaacttttttccgccttcgcgcagtgaagag
taaagcttaccggaaagcagctgtgccagatggttgttgagcgcgccgacattttcggaaatcgacatttcattgtc
gttgagaatcaccagcatatcaggacggatatcgcccgcgtgattcatcgcttcaaacgccatgcctgcggtaatc
gcgccatcgccaatgacacagacggtgcggcgatttttgccttctttttcggcagcaaccgcaataccaattccgg
cactgatggaggttgatgaatgcccgacgcttaatacgtcatatttcgcttccgccgccacgggaacgggtgca
gaccgccttctgacggatggtgccgatttgtcgcggcgtccggtcaaaaattttatgcggataagcctgatgcccca
catcccaaatcaattggtcaaacggggtgtgtagacatagtgcagcgccacggtcagttcgaccgtgcccagcc
cggaggcgaagtgcccgctggaacggctcacgctgtcgagtaaatagcggcgcagttcgtcgcagagtttcggt
aaactctcttcggcaacagtcgtaactcctgggtggagtcgaccagtgccagggtcgggtattggcaatatcaa
aactcatgttttttaacctcctaagggcgaatgcagttagacatacatcagctggttaatcgggaaagggtcaatca
gcagcagttgatgcggtttcagtcgcgtagtctgggcgacccagaccatcgccatactggtaggtgcagtggga
aacacgtgccatgttaactgcgatttccatgaacgctttaggcagcagggtggagtcgctaacgcgttcacg

Fig. 45B

attcatctttttccattcggcgtcgatcagtttacgcagttcttcgcgggcctgttcctcgctggtaccatcgttttcgtgca
tgtagctaatgatagaattggtagtctcgccacgttccagctccgccgcagaggtggccagatcgttgcacaggc
ggaagataacgcagctagaacgcaccagaccatggaagtcggtcagggaacgcagcgcgtggtcggagatg
tcttcctgctgctggcatacggaaaagtaagacggcgccagcagcgctacaccggaggaggaaacgctggcgt
tttccaggtacttggagaaagccgggataaatttgttgttggaccatttcgcctcttgcagaaaggcttgcacagttca
cgccagctttcgtcagataggacaggttgttatgaccttctcttcagaatagaataggacgtgtcgttaacggtgtt
gtacagtgccaggaaacacagtttcatatagtccggcagggtgttaatagcgttaacgtcccagcgctctacagc
atcggtgaacagttgcagttcgtccagagtgccataaaacgtcatacacgtcatcgatgatcgtcaccagaccaaa
cattttagtaacagctttgcgacattcaccaaactgcgggtctggcgccatacccagtgcccagaaataaacttcc
atcaggcggtcgcgtacaaaatccagtttgctagccaggcccatctcggtccaccagcgggacagatcttgcag
ctctttctggtgcagggtctgtaccatgttaaaatccagcttcgccagctccagcagcagctggtgatgcggttctttc
ggttcgtatttatccaggaaccaacgtgcctccagacggtgcagacgctggtgatatggcagttccagggcgtgg
ctcacttgttctgcaaccttggtattaatgccttctttcaggttgttcttcaggtgggtgatggaaaaggtacgcgcctcc
tccagcaggttctcaccctcgaaacccaggtaagacgcttcatacaggctcagcaggccttggacgtcaccttca
gttcaccgctgaaaccaccttcttatccttgaaacgctcaaaaacatcctgagaaacctcgaaaccgtgctgacg
cagcagacggaaagacagagcggttgcgtgcaggtcagattgttcttttgtttcgtccagcagtacgatgtttcc
agggctttaatgatgtcttttttcaaatttgtaggtcagacccaggcgctgcacatcgtcgatcagctccagcaggga
cagcggctgggtgtctacacggttgatcatgcagcgaacttcttcctccagtttggtcgctttctcctccagctttttcca
ctttcaggtcgttctccagggattgcaggaattcgaaattccacaggtttggctgatagtttgcggaacgacgggaa
ttatgctcggtaatctgagtaaattgagaagaggtcgcacacatggtttattcctccttatttaatcgatacattaatata
tacctctttaatttttaataataaagttaatcgataattccggtcgagtgcccacacagattgtctgataaattgttaaag
agcagtgccgcttgctttttctcagcggcgctgtttcctgtgtgaaattgttatccgctcacaattccacacattatacg
agccggatgattaattgtcaacagctcatttcagaatctggcgtaatagcgaagaggcccgcaccgatcgcccttc
ccaacagttgcgcagcctgaatggcgaatggcgcctgatgcggtatttttctccttacgcatctgtgcggtatttcaca
ccgcatatggtgcactctcagtacaatctgctctgatgccgcatagttaagccagccccgacacccgccaacacc
cgctgacgagcttagtaaagccctcgctagattttaatgcggatgttgcgattacttcgccaactattgcgataacaa
gaaaaagccagcctttcatgatatatctcccaatttgtgtagggcttattatgcacgcttaaaaataataaaagcag
acttgacctgatagtttggctgtgagcaattatgtgcttagtgcatctaacgcttgagttaagccgcgccgcgaagcg
gcgtcggcttgaacgaattgttagacattatttgccgactaccttggtgatctcgcctttcacgtagtggacaaatcttt
ccaactgatctgcgcgcgaggccaagcgatcttcttcttgtccaagataagcctgtctagcttcaagtatgacgggc
tgatactgggccggcaggcgctccattgcccagtcggcagcgacatccttcggcgcgatttgccggttactgcgc
tgtaccaaatgcgggacaacgtaagcactacatttcgctcatcgccagcccagtcgggcggcgagttccatagc
gttaaggtttcatttagcgcctcaaatagatcctgttcaggaaccggatcaaagagttcctccgccgctggacctac
caaggcaacgctatgttctcttgcttttgtcagcaagatagccagatcaatgtcgatcgtggctggctcgaagatac
ctgcaagaatgtcattgcgctgccattctccaaattgcagttcgcgcttagctggataacgccacggaatgatgtcg
tcgtgcacaacaatggtgacttctacagcgcggagaatctcgctctctccagggaagccgaagtttccaaaag
gtcgttgatcaaagctcgccgcgttgtttcatcaagc

Fig. 45C

cttacggtcaccgtaaccagcaaatcaatatcactgtgtggcttcaggccgccatccactgcggagccgtaca
aatgtacggccagcaacgtcggttcgagatggcgctcgatgacgccaactacctctgatagttgagtcgatact
tcggcgatcaccgcttccctcatgatgtttaactttgtttagggcgactgccctgctgcgtaacatcgttgctgctc
cataacatcaaacatcgacccacggcgtaacgcgcttgctgcttggatgcccgaggcatagactgtacccca
aaaaaacagtcataacaagccatgaaaaccgccactgcgccgttaccaccgctgcgttcggtcaaggttctg
gaccagttgcgtgagcgcatacgctacttgcattacagcttacgaaccgaacaggcttatgtccactgggttcgt
gccttcatccgtttccacggtgtgcgtcacccggcaaccttgggcagcagcgaagtcgaggcatttctgtcctgg
ctggcgaacgagcgcaaggtttcggtctccacgcatcgtcaggcattggcggccttgctgttcttctacggcaa
ggtgctgtgcacggatctgccctggcttcaggagatcggaagacctcggccgtcgcggcgctgccggtggtg
ctgaccccggatgaagtggttcgcatcctcggttttctggaaggcgagcatcgtttgttcgcccagcttctgtatgg
aacgggcatgcggatcagtgagggtttgcaactgcgggtcaaggatctggatttcgatcacggcacgatcatc
gtgcgggagggcaagggctccaaggatcgggccttgatgttacccgagagcttggcacccagcctgcgcga
gcagggggaattaattcccacgggttttgctgcccgcaaacgggctgttctggtggtggctagtttgttatcagaatcg
cagatccggcttcagccggtttgccggctgaaagcgctatttcttccagaattgccatgattttttccccacgggga
ggcgtcactggctcccgtgttgtcggcagcttgatcgataagcagcatcgcctgtttcaggctgtctatgtgtga
ctgttgagctgtaacaagttgtctcaggtgttcaatttcatgttctagttgctttgtttactggtttcacctgttctattag
gtgttacatgctgttcatctgttacattgtcgatctgttcatggtgaacagctttgaatgcaccaaaaactcgtaaaa
gctctgatgtatctatctttttacaccgttttcatctgtgcatatggacagtttcccttgatatgtaacggtgaacagt
tgttctactttgttgttagtcttgatgcttcactgatagatacaagagccataagaacctcagatccttccgtatttа
gccagtatgttctctagtgtggttcgttgttttgcgtgagccatgagaacgaaccattgagatcatacttactttgca
tgtcactcaaaaattttgcctcaaaactggtgagctgaatttttgcagttaaagcatcgtgtagtgttttcttagtcc
gttatgtaggtaggaatctgatgtaatggttgttggtattttgtcaccattcatttttatctggttgttctcaagttcggtta
cgagatccatttgtctatctagttcaacttggaaaatcaacgtatcagtcgggcggcctcgcttatcaaccacca
attcataatgctgtaagtgtttaaatctttacttattggtttcaaaacccattggttaagccttttaaactcatggtagtt
atttcaagcattaacatgaacttaaattcatcaaggctaatctctatatttgccttgtgagttttcttttgtgttagttctttt
taataaccactcataaatcctcatagagtatttgtttcaaaagacttaacatgttccagattatattttatgaatttttt
aactggaaaagataaggcaatatctcttcactaaaaactaatttctaatttttcgcttgagaacttggcatagtttgt
ccactggaaaatctcaaagccttaaccaaaggattcctgatttccacagttctcgtcatcagctctctggttgcttt
agctaatacaccataagcatttccctactgatgttcatcatctgagcgtattggttataagtgaacgataccgtcc
gttctttccttgtagggtttcaatcgtggggttgagtagtgccacacagcataaaattagcttggtttcatgctccgtt
aagtcatagcgactaatcgctagttcatttgctttgaaaacaactaattcagacatacatctcaattggtctaggtg
attttaatcactataccaattgagatgggctagtcaatgataattactagtccttttcctttgagttgtgggtatctgta
aattctgctagaccttttgctggaaaacttgtaaattctgctagaccctctgtaaattccgctagaccttttgtgtgttttt
ttgtttatattcaagtggttataatttatagaataaagaaagaataaaaaaaagataaaaagaatagatcccagc
cctgtgtataactcactacttagtcagttccgcagtattacaaaaggatgtcgcaaacgctgtttgctcctctacа
aaacagaccttaaaaccctaaaggcttaagtagcaccctcgcaagctcgggcaaatcgctgaatattccttttg
tctccgaccatcaggcaccctgagtcgctgtctttttc

Fig. 45D

Gtgacattcagttcgctgcgctcacggctctggcagtgaatggggtaaatggcactacaggcgcctttatggatt
catgcaaggaaactacccataatacaagaaaagcccgtcacgggctttctcagggcgtttatggcgggtctgcta
tgtggtgctatctgactttttgctgttcagcagttcctgccctctgatttccagtctgaccacttcggattatcccgtgaca
ggtcattcagactggctaatgcacccagtaaggcagcggtatcatcaacaggctta

(SEQ ID NO:55)

Fig. 46A

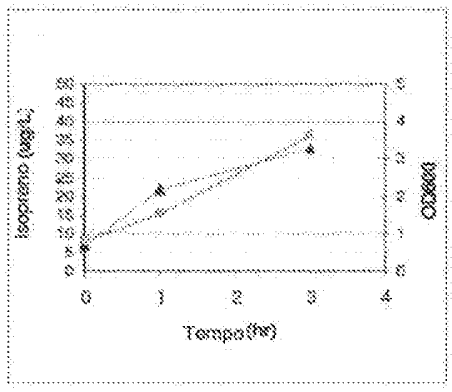


Fig. 46B

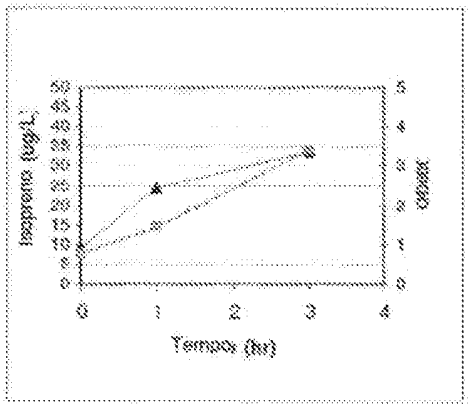


Fig. 46C

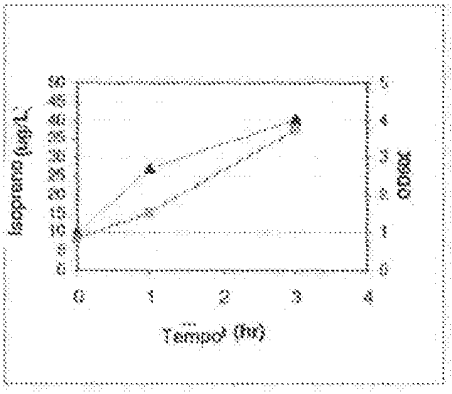


Fig. 46D

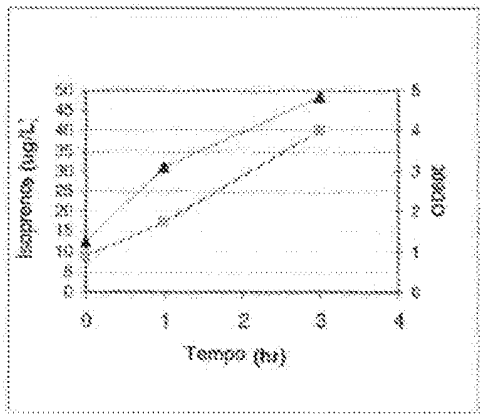


Fig. 46E

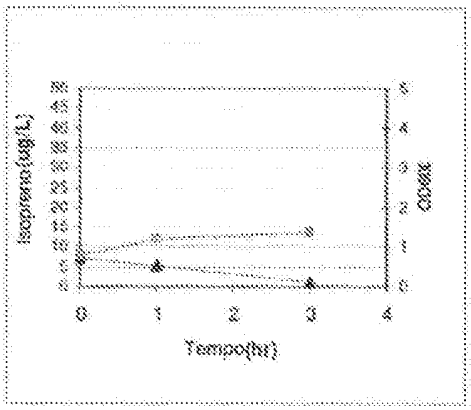


Fig. 47A

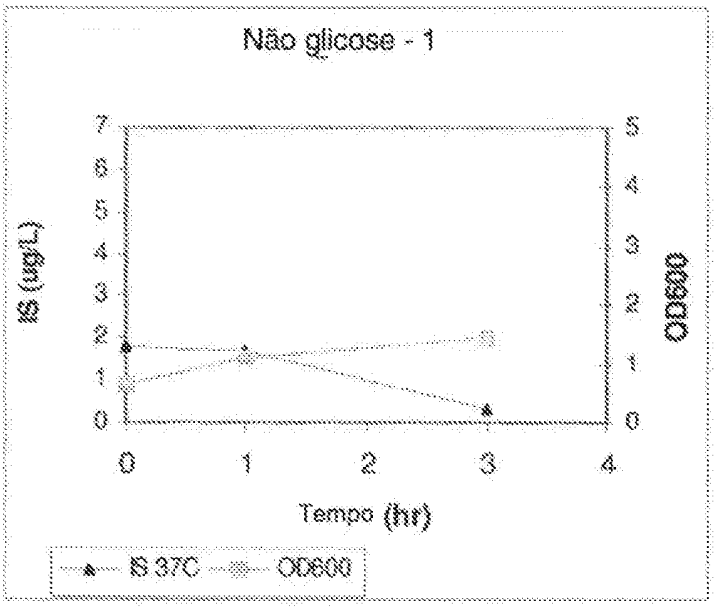


Fig. 47B

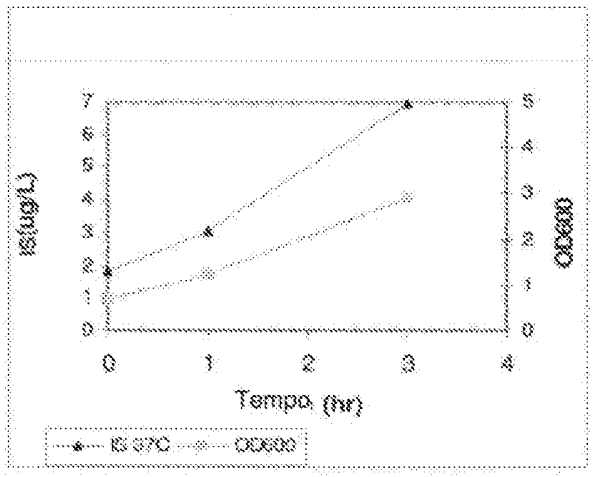


Fig. 47C

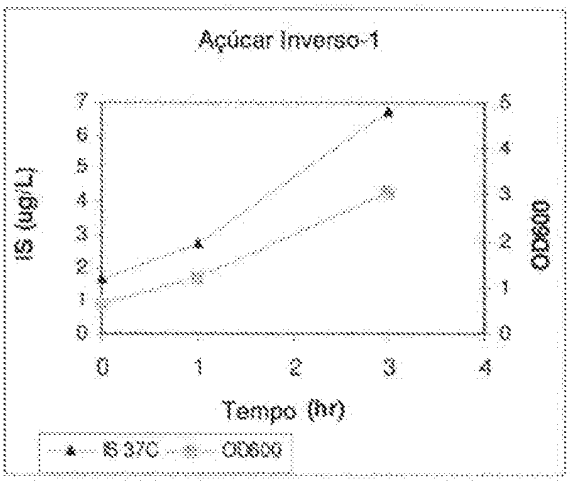


Fig. 47D

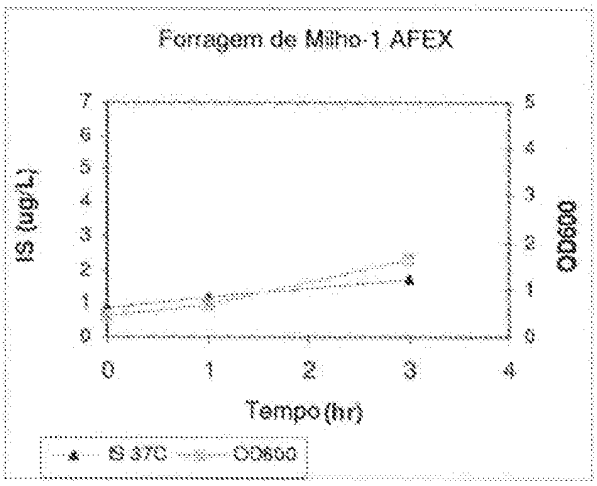


Fig. 48A

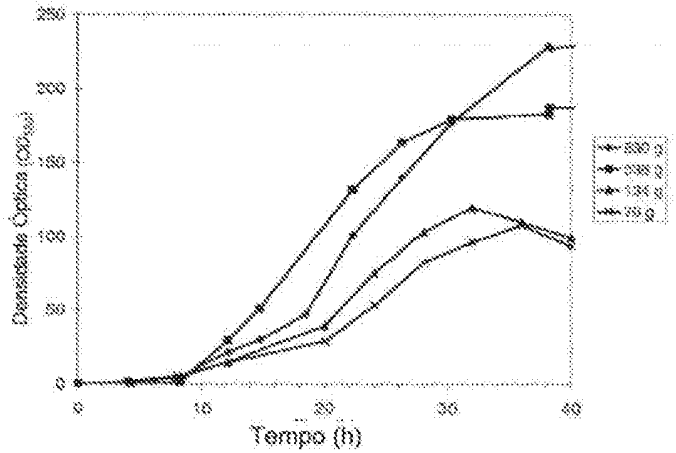


Fig. 48B

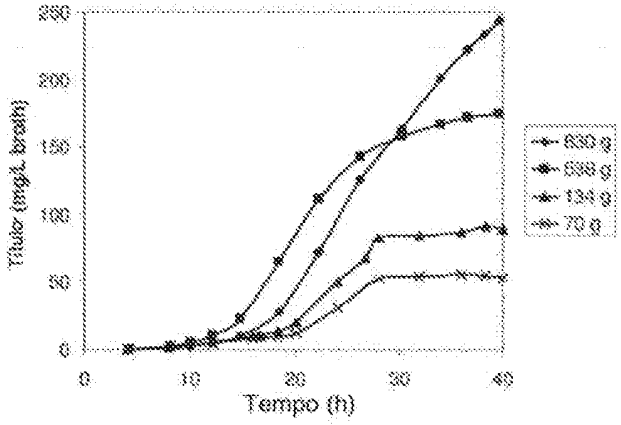

Título (mg/L kg/g tuta)
0
50
100
150
200
250
0
10
20
30
40
Tempo (h)
630 g
538 g
134 g
70 g

Fig. 48C

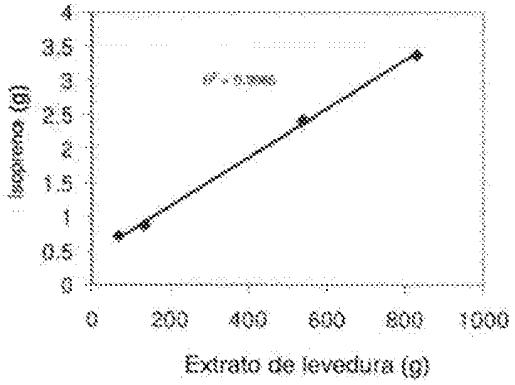


Fig. 49A

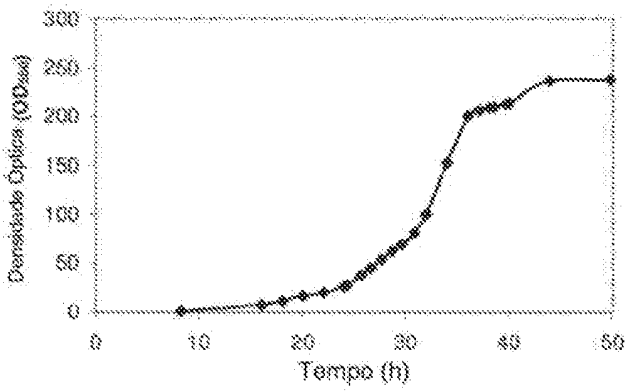

300
250
200
150
100
50
0
Densidade Óptica (OD600nm)
0
10
20
30
40
50
Tempo (h)

Fig. 49B

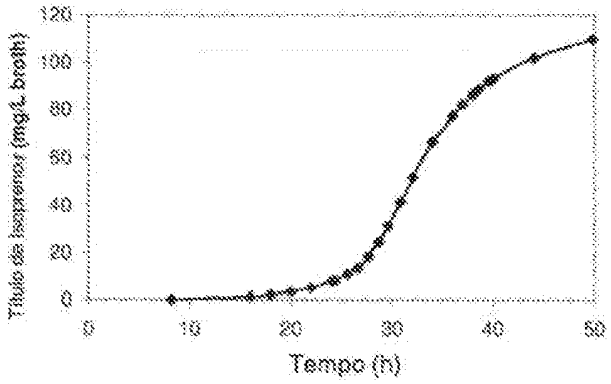

Título de isoprenol (mg/L broth)
120
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
50
Tempo (h)

Fig. 49C

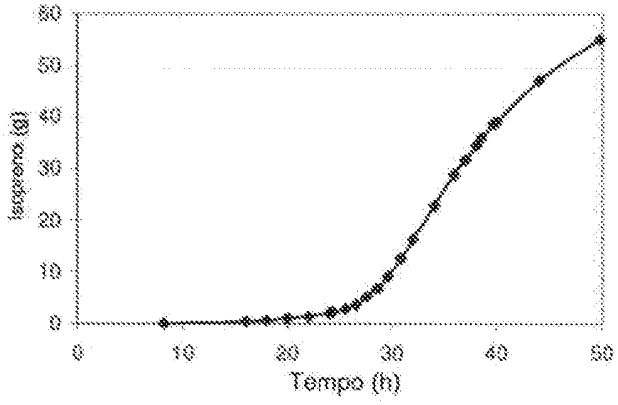


Fig. 50

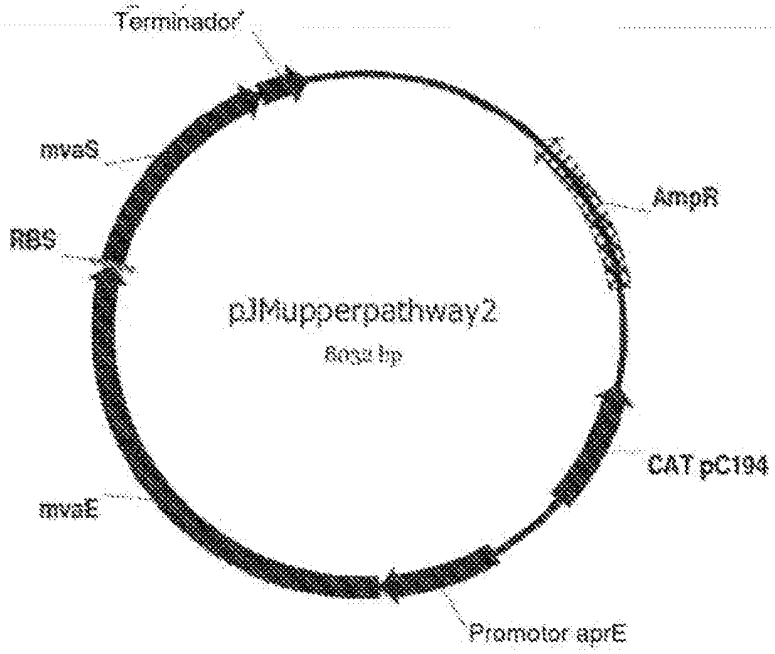

Terminador
mvaS
RBS
AmpR
pJMupperpathway2
CAT pC194
mvaE
Promotor aprE

Fig. 51A

5'-

tcgctgcgctcggtcgttcggctgcggcgagcggtatcagctcactcaaaggcggtaatacggttatccacaga
atcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaagg
ccgcgttgctggcgtttttccataggctccgcccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcagaggt
ggcgaaaccgacaggactataaagataccaggcgtttccccctggaagctccctcgtgcgctctcctgttccg
accctgccgcttaccggatacctgtccgcctttctcccttcgggaagcgtggcgctttctcatagctcacgctgtag
gtatctcagttcggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaaccccccgttcagcccgaccgctgc
gccttatccggtaactatcgtcttgagtccaacccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggt
aacaggattagcagagcgaggtatgtaggcggtgctacagagttcttgaagtggtggcctaactacggctacac
tagaagaacagtatttggtatctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccg
gcaaacaaaccaccgctggtagcggtggttttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatct
caagaagatcctttgatcttttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggatttggtcat
gagattatcaaaaaggatcttcacctagatccttttaaattaaaaatgaagttttaaatcaatctaaagtatatatga
gtaaacttggtctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgatctgtctatttcgttcatccata
gttgcctgactccccgtcgtgtagataactacgatacgggagggcttaccatctggccccagtgctgcaatgata
ccgcgagacccacgctcaccggctccagatttatcagcaataaaccagccagccggaagggccgagcgca
gaagtggtcctgcaactttatccgcctccatccagtctattaattgttgccgggaagctagagtaagtagttcgcca
gttaatagtttgcgcaacgttgttgccattgctacaggcatcgtggtgtcacgctcgtcgtttggtatggcttcattcag
ctccggttcccaacgatcaaggcgagttacatgatcccccatgttgtgcaaaaaagcggttagctccttcggtcct
ccgatcgttgtcagaagtaagttggccgcagtgttatcactcatggttatggcagcactgcataattctcttactgtc
atgccatccgtaagatgcttttctgtgactggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgtatgcggcgacc
gagttgctcttgcccggcgtcaatacgggataataccgcgccacatagcagaactttaaaagtgctcatcattgg
aaaacgttcttcggggcgaaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcgatgtaacccactcgtgca
cccaactgatcttcagcatcttttactttcaccagcgtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgca
aaaaagggaataagggcgacacggaaatgttgaatactcatactcttcctttttcaatattattgaagcatttatca
gggttattgtctcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataaacaaatagggggttccgcgcacatttc
cccgaaaagtgccacctgacgtctaagaaaccattattatcatgacattaacctataaaaataggcgtatcacg
aggccctttcgtctcgcgcgtttcggtgatgacggtgaaaacctctgacacatgcagctcccggagacggtcac
agctgtctgtaagcggatgccgggagcagacaagcccgtcagggcgcgtcagcgggtgttggcgggtgtcg
gggctggcttaactatgcggcatcagagcagattgtactgagagtgcaccatagatctggagctgtaatataaa
aaccttcttcaactaacggggcaggttagtgacattagaaaaccgactgtaaaaagtacagtcggcattatctca
tattataaaagccagtcattaggcctatctgacaattcctgaatagagttcataaacaatcctgcatgataaccatc
acaaacagaatgatgtacctgtaaagatagcggtaaatatattgaattacctttattaatgaatttttcctgctgtaata
atgggtagaaggtaattactattattgatatttaagttaaacccagtaaatgaagtccatggaataatagaaag
agaaaaagcattttcaggtataggtgttttgggaaacaatttcccctgaaccattatatttctctacatcagaaaggt
ataaatcataaaaactcttgaagtcattctttacaggagtccaaataccagagaatgtttagatacaccatcaaa
aattgtataaagtggctctaacttatcccaataacctaactctccgtcgctattgtaaccagttctaaaagctgtattt
gagtttatcacccttgtcactaagaaaataaatgcagggtaaaatttatatccttcttgtttttatgttttc

Fig. 51B

ggtataaaacactaatatcaatttctgtggttatactaaaagtcgtttgttggttcaaataatgattaaatatctc
ttttctcttccaattgtctaaatcaatttttattaaagttcatttgatatgcctcctaaatttttatctaaagtgaatttta
ggaggcttactgtctgctttcttcattagaatcaatccttttttaaaagtcaatattactgtaacataaatatatat
tttaaaaatatcccacttttatccaatttttcgtttgttgtgaactaatgggtgctttagttgaagaataaaagacctat
gcggtgtgaaataccgcacagatgcgtaaggagaaaataccgcatcaggcgccattcgccattcaggc
tgcgcaactgttgggaagggcgatcggtgcgggcctcttcgctattacgccagctggcgaaaggggat
gtgctgcaaggcgattaagttgggtaacgccagggttttcccagtcacgacgttgtaaaacgacggccag
tgccaagcttgcatgcctgcactccatttcttctgctatcaaaataacagactcgtgatttccaaacgagct
ttcaaaaaagcctctgcccttgcaaatcggatgcctgtctataaaattcccgatattggttaaacagcggc
gcaatggcggccgcatctgatgtcttgcttggcgaatgttcatcttatttcttcctccctctcaataatttttttcatt
ctatccctttttctgtaaagtttatttttcagaatactttatcatcatgcttgaaaaaatatcacgataatatccatt
gttctcacggaagcacacgcaggtcatttgaacgaatttttcgacaggaatttgccgggactcaggagca
tttaacctaaaaaaagcatgacatttcagcataatgaacatttactcatgtctatttttcgttcttttctgtatgaaaa
tagttatttcgagtctctacggaaatagcgagagatgatatacctaaatagagataaaatcatctcaaaaa
aatgggtctactaaaatattattccatctattacaataaattcacagaatagtcttttaagtaagtctactctga
atttttttaaaaggagagggtaaagagtgaaaacagtagttattattgatgcattacgaacaccaattggaa
aatataaaggcagcttaagtcaagtaagtgccgtagacttaggaacacatgttacaacacaacttttaaa
aagacattccactatttctgaagaaattgatcaagtaatcttggaaatgttttacaagctggaaatggccaa
aatcccgcacgacaaatagcaataaacagcggtttgtctcatgaaattcccgcaatgacggttaatgagg
tctgcggatcaggaatgaaggccgttatttggcgaaacaattgattcaattaggagaagcggaagtttta
attgctggcgggattgagaatatgtcccaagcacctaaattacaacgtttaattacgaaacagaaagcta
cgatgcgccttttctagtatgatgtatgatggattaacggatgccttagtggtcaggcaatgggcttaactg
ctgaaaatgtggccgaaaagtatcatgtaaclagagaagagcaagatcaatttctgtacattcacaatta
aaagcagctcaagcacaagcagaagggatattcgctgacgaaatagccccattagaagtatcaggaa
cgcttgtggagaaagatgaagggattcgccctaattcgagcgtgagaagctaggaacgcttaaaacag
ttttaaagaagacggtactgtaacagcagggaatgcatcaaccattaatgatggggcttctgcttgattatt
gcttcacaagaatatgccgaagcacacggtcttcctttatttagctattattcgagacagtgtggaagtcggt
attgatccagcctatatgggaatttcgccgattaaagccattcaaaaactgttagcgcgcaatcaacttact
acggaagaaattgatctgtatgaaatcaacgaagcatttgcagcaacttcaatcgtggtccaaagagaa
ctggctttaccagaggaaaaggtcaacatttatggtggcggtatttcattaggtcatgcgattggtgccaca
ggtgctcgtttattaacgagttaagttatcaattaaatcaaaaagaaaagaaatatggagtggcttctttatg
tatcggcggtggcttaggactcgctatgctactagagagacctcagcaaaaaaaaaacagccgatttttat
caaatgagtcctgaggaacgcctggcttctcttcttaatgaaggccagatttctgctgatacaaaaaaaga
atttgaaaatacggctttatcttcgcagattgccaatcatatgattgaaaatcaaatcagtgaaacagaagt
gccgatgggcgtggcttacattaacagtggacgaaactgattattggtaccaatggcgacagaagag
cctcagttattgcggctttgagtaatggtgcaaaaatagcacaaggatttaaaacagtgaatcaacaac
gcttaatgcgtggacaaatcgtttttacgatgttgcagatcccgagtcattgattgataaactacaaglaag
agaagcggaagttttcaacaagcagagttaagttatccatctatcgttaaacggggcggcggcttaaga
gatttgcaatatcgtacttttgatgaatcatttgtatctgtcgacttttagtagatgttaaggatgcaatggggg
caaatatcgttaacgctatgtggaaggtgtg

Fig. 51C

gccgagttgttccgtgaatggtttgcggagcaaaagattttattcagtattttaagtaattatgccacggagtcggttg
ttacgatgaaaacggctattccagtttcacgtttaagtaaggggagcaatggccgggaaattgctgaaaaaattg
ttttagcttcacgctatgcttcattagatccttatcgggcagtcacgcataacaaaggaatcatgaatggcattgaa
gctgtagttttagctacaggaaatgatacacgcgctgttagcgcttcttgtcatgcttttgcggtgaaggaaggtcgc
taccaaggcttgactagttggacgctggatggcgaacaactaattggtgaaatttcagttccgcttgctttagccac
ggttggcggtgccacaaaagtcttacctaaatctcaagcagctgctgattgttagcagtgacggatgcaaaaga
actaagtcgagtagtagcggctgttggtttggcacaaaatttagcggcgttacgggccttagtctctgaaggaatt
caaaaaggacacatggctctacaagcacgttcttttagcgatgacggtcggagctactggtaaagaagttgagg
cagtcgctcaacaattaaaacgtcaaaaaacgatgaaccaagaccgagccatggctatttaaatgatttaaga
aaacaataaaaggagagggtgacaattgggattgataaaattagttttttgtgccccttattatattgatatgacg
gcactggctgaagccagaaatgtagaccctggaaaatttcatattggtattgggcaagaccaaatggcggtga
acccaatcagccaagatattgtgacatttgcagccaatgccgcagaagcgatcttgaccaaagaagataaag
aggccattgatatggtgattgtcgggactgagtccagtatcgatgagtcaaaagcggccgcagttgtcttacatcg
tttaatggggattcaaccttcgctcgctctttcgaaatcaaggaagcttgttacggagcaacagcaggcttacagt
tagctaagaatcacgtagccttacatccagataaaaaagtctggtcgtagcggcagatattgcaaaatatggct
taaattctggcggtgagcctacacaaggagctggggcggttgcaatgttagttgctagtgaaccgcgcatttggc
tttaaaagaggataatgtgatgctgacgcaagatatctatgacttttggcgtccaacaggccacccgtatcctatg
gtcgatggtcctttgtcaaacgaaacctacatccaatctttgcccaagtctgggatgaacataaaaaaacgaaacc
ggtcttgatttgcagattatgatgctttagcgttccatattccttacacaaaaatgggcaaaaaagccttattagca
aaaatctccgaccaaactgaagcagaacaggaacgaatttttagcccgttatgaagaaagtatcgtctatagtcg
tcgcgtaggaaaacttgtatacgggttcacttatctgggactcatttccctttagaaaatgcaacgacttaaccgc
aggcaatcaaattggtttattcagttatggttctggtgctgtcgtgaatttttcactggtgaattagtagctggttatca
aaatcatttacaaaaagaaactcatttagcactgctggataatcggacagaaccttctatcgctgaatatgaagcc
atgtttgcagaaacttagacacagacattgatcaaacgttagaagatgaattaaaatatagtatttctgctattaat
aatacgttcgttcttatcgaaactaaaaaaaaaccggccttggccccgccggttttttattatttttcttcctccgcatgt
tcaatccgctccataatcgacggatggctcctctgtaaaatttaacgagaaacggcgggttgacccggctcagt
cccgtaacggccaagtcctgaaacgtctcaatcgccgctccccggtttccggtcagctcaatgccgtaacgggtcg
gcggcgttttcctgataccgggagacggcattcgtaatcgggatccccgggtaccgagctcgaattcgtaatcat
gtcatagctgtttcctgtgtgaaattgttatccgctcacaattccacacaacatacgagccggaagcataaagtgt
aaagcctggggtgcctaatgagtgagctaactcacattaattgcgttgcgctcactgcccgctttccagtcgggaa
acctgtcgtgccagctgcattaatgaatcggccaacgcgcggggagaggcggtttgcgtattgggcgctcttccg
cttcctcgctcactgac

(SEQ ID NO:56)

Fig. 52

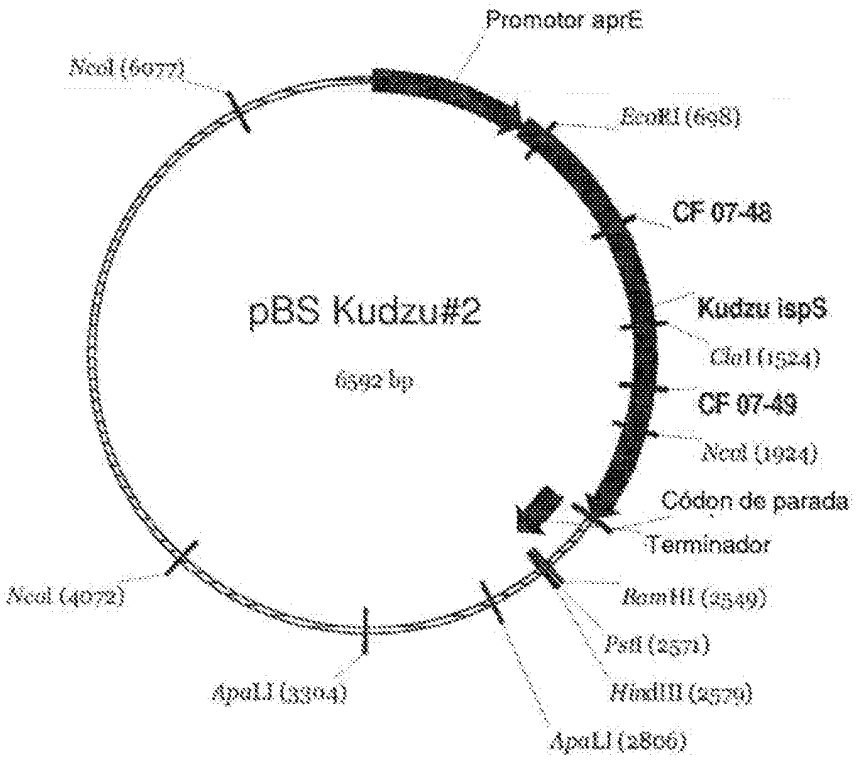

Promotor aprE
NcoI (6077)
EcoRI (698)
CF 07-48
pBS Kudzu#2
6692 bp
Kudzu ispS
ClaI (1524)
CF 07-49
NcoI (1924)
Códon de parada
Terminador
NcoI (4072)
BamHI (2349)
PstI (2571)
HindIII (2579)
ApaLI (3304)
ApaLI (2806)

Fig. 53A

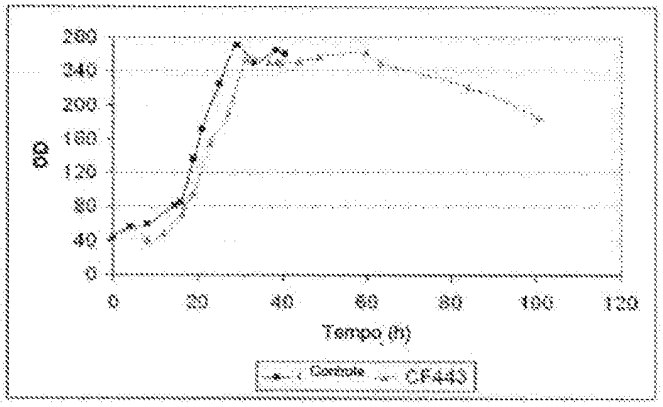

280
240
200
160
120
80
40
0
0
20
40
60
80
100
120
Tempo (h)
Controle
CF443

Fig. 53B

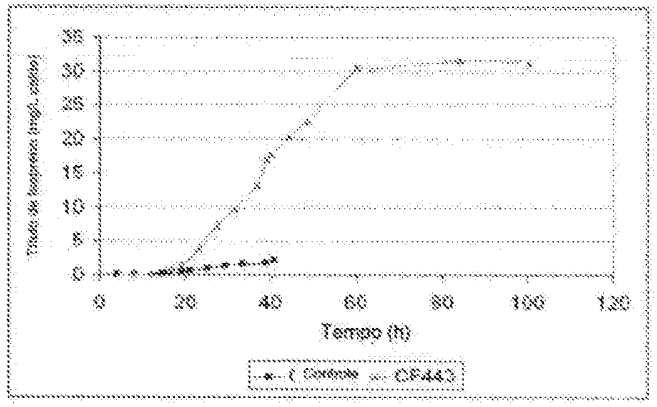


Fig. 54

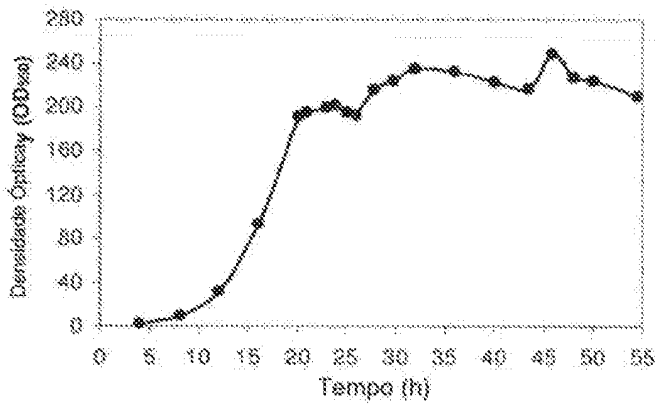

Densidade Óptica (OD600nm)
280
240
200
160
120
80
40
0
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55
Tempo (h)

Fig. 55

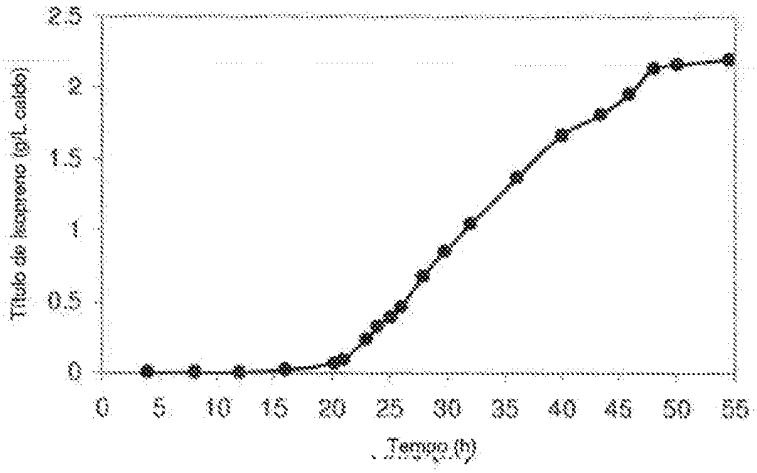

Título de licopeno (g/L caldo)
2,5
2
1,5
1
0,5
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
Tempo (h)

Fig. 56

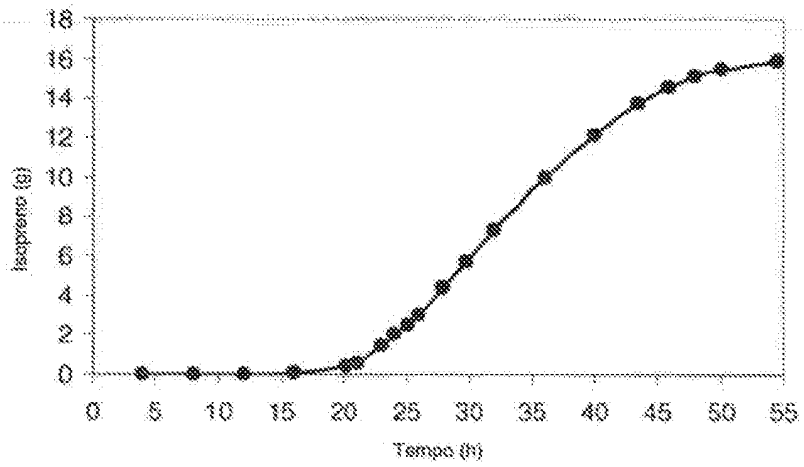

18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
Iscapresso (g)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
Tempo (h)

Fig. 57

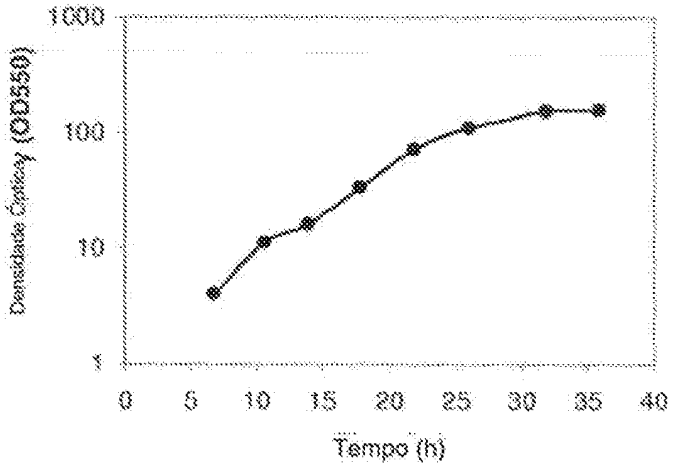

1000
100
10
1
Densidade Óptica (OD550)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Tempo (h)

Fig. 58

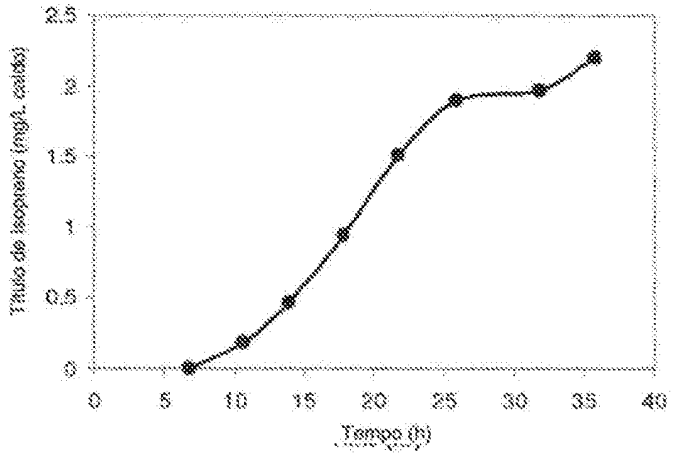

Título de licopeno (mg/L caldo)
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Tempo (h)

Fig. 59

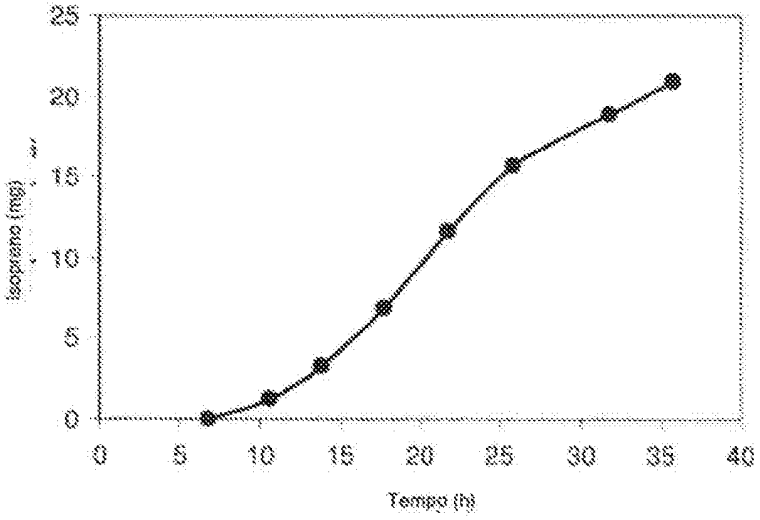


Fig. 60A

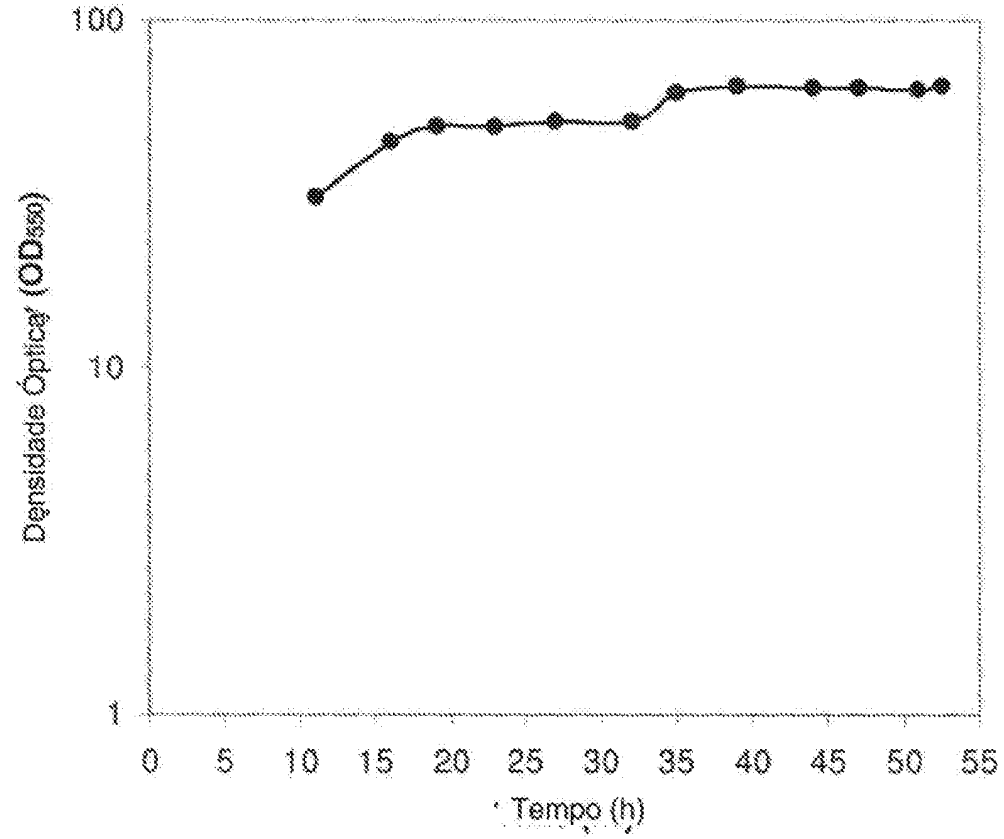

100
10
1
Densidade Óptica (OD600)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
Tempo (h)

Fig. 60B

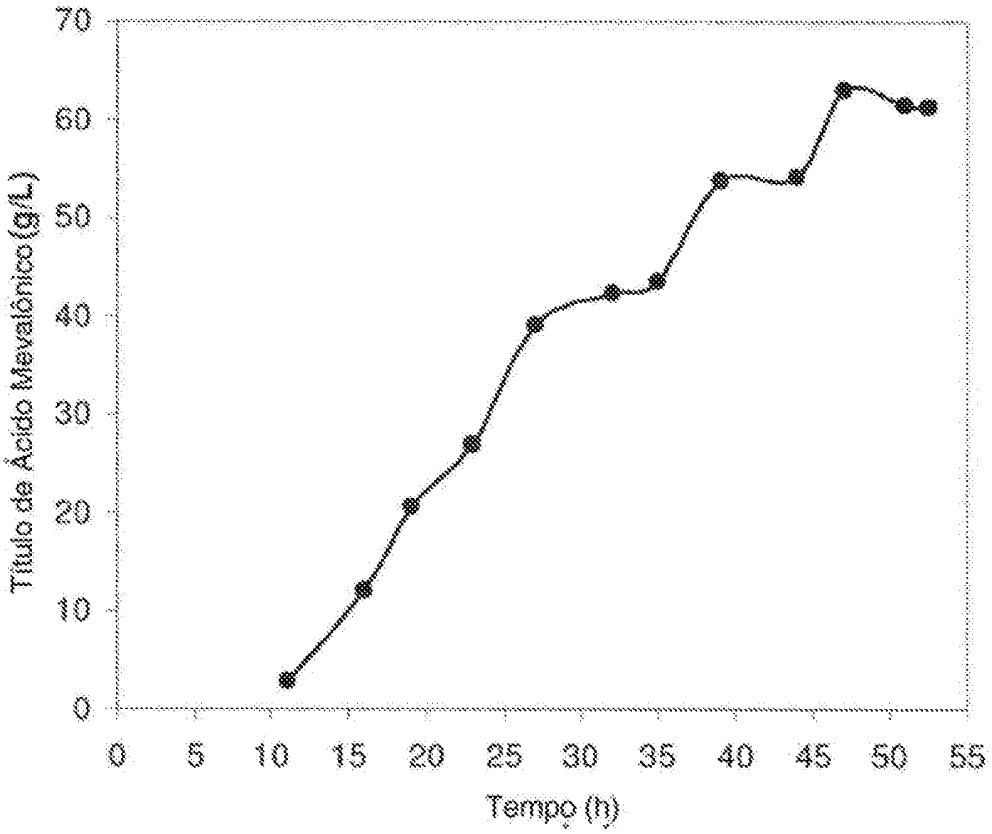

Título de Ácido Mevalônico (g/L)
70
60
50
40
30
20
10
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
Tempo (h)

Fig. 60C

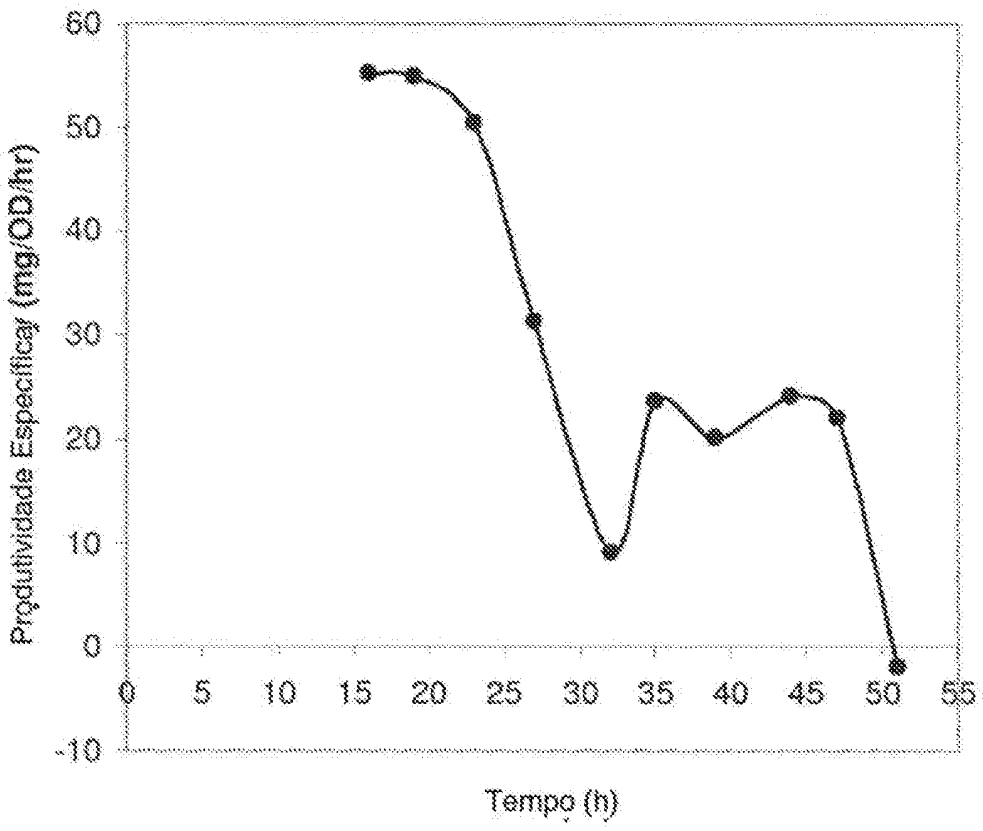

Produtividade Específica (mg/OD/hr)
60
50
40
30
20
10
0
-10
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
Tempo (h)

Fig. 61A

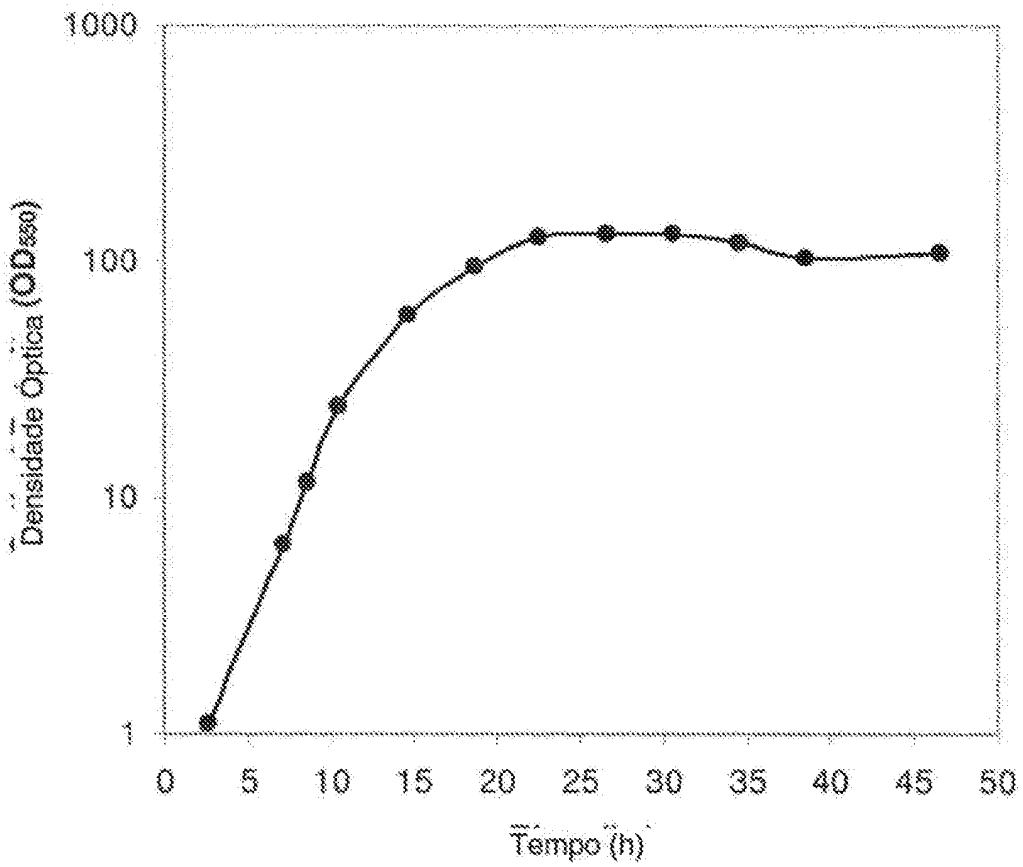

1000
100
10
1
Densidade Óptica (OD600)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
Tempo (h)

Fig. 61B

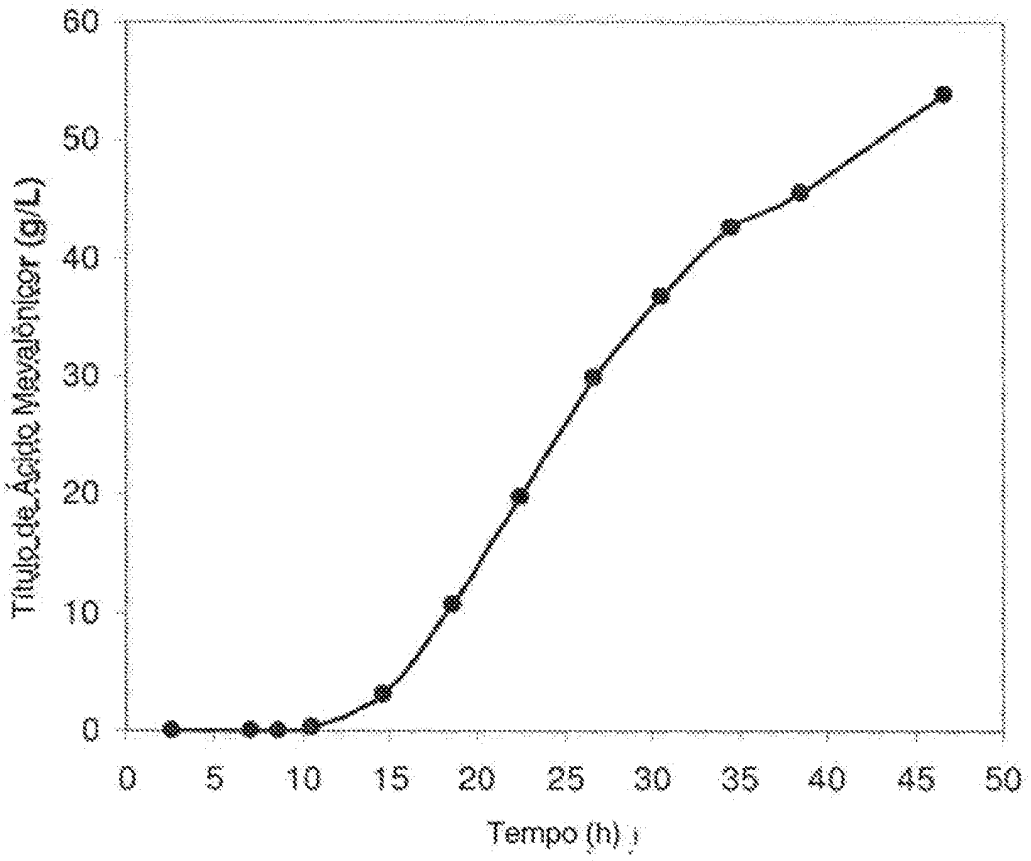

Título de Ácido Mevalônico (g/L)
60
50
40
30
20
10
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
Tempo (h)

Fig. 61C

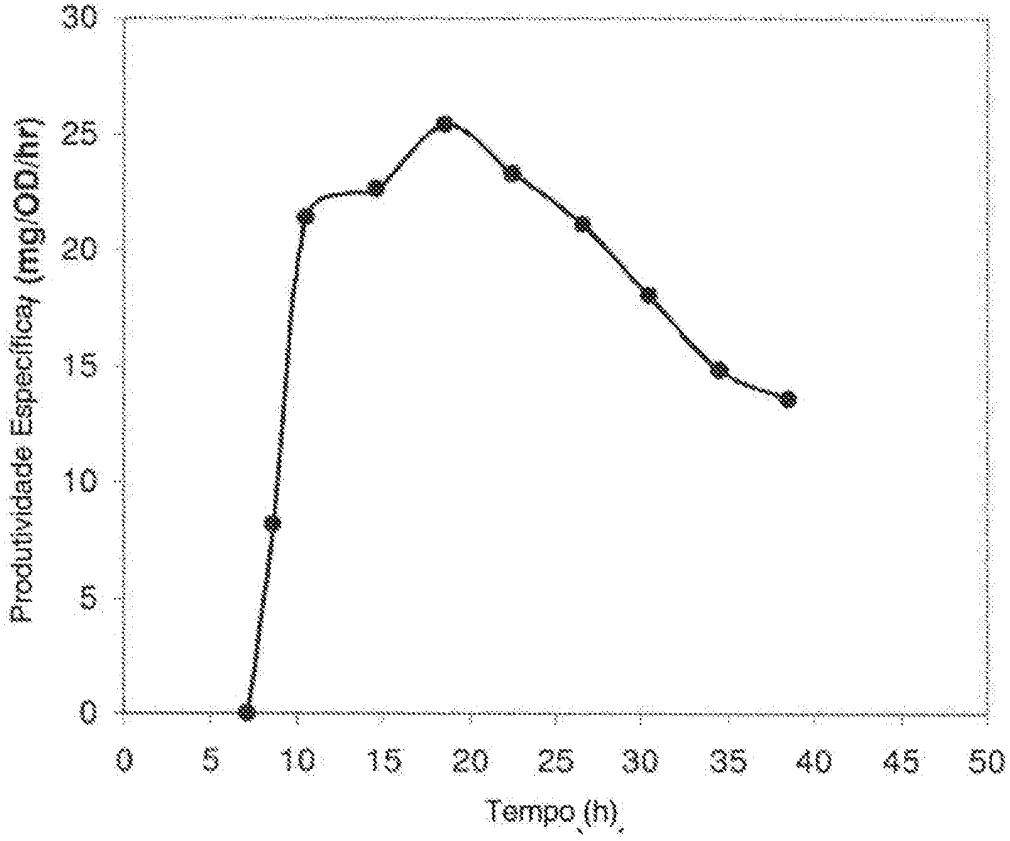

30
25
20
15
10
5
0
Produtividade Específica (mg/OD/hr)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
Tempo (h)

Fig. 62A

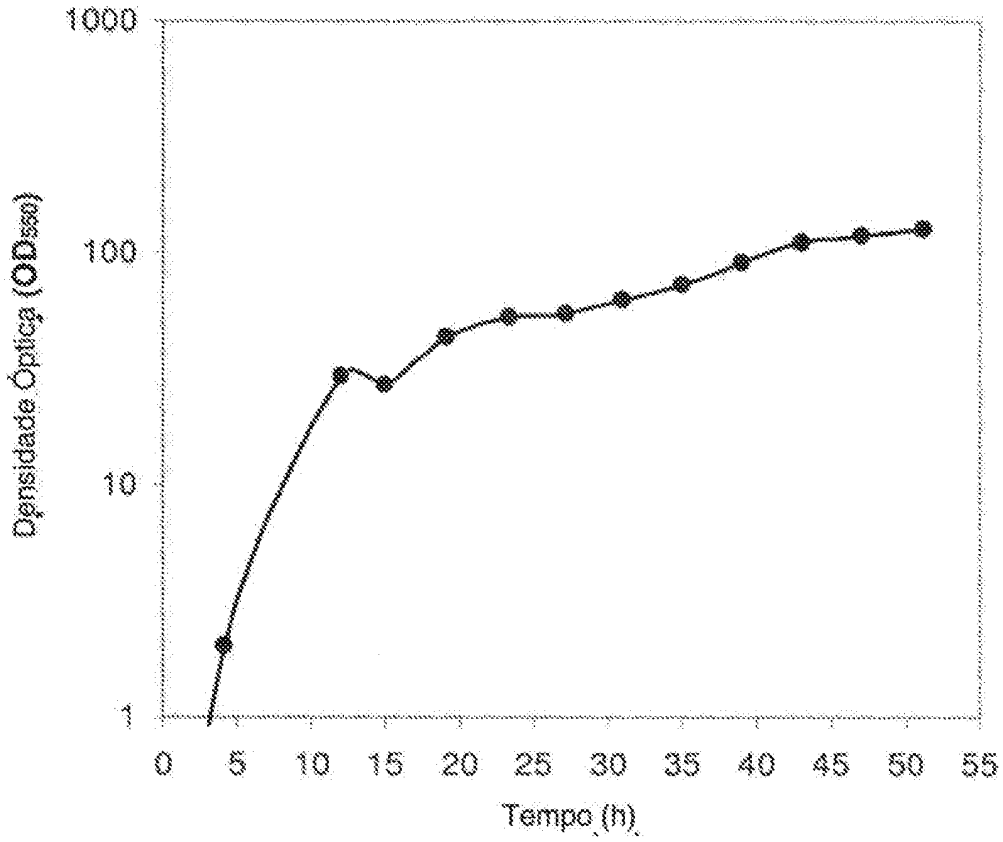

1000
100
10
1
Densidade Óptica (OD600)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
Tempo (h)

Fig. 62B

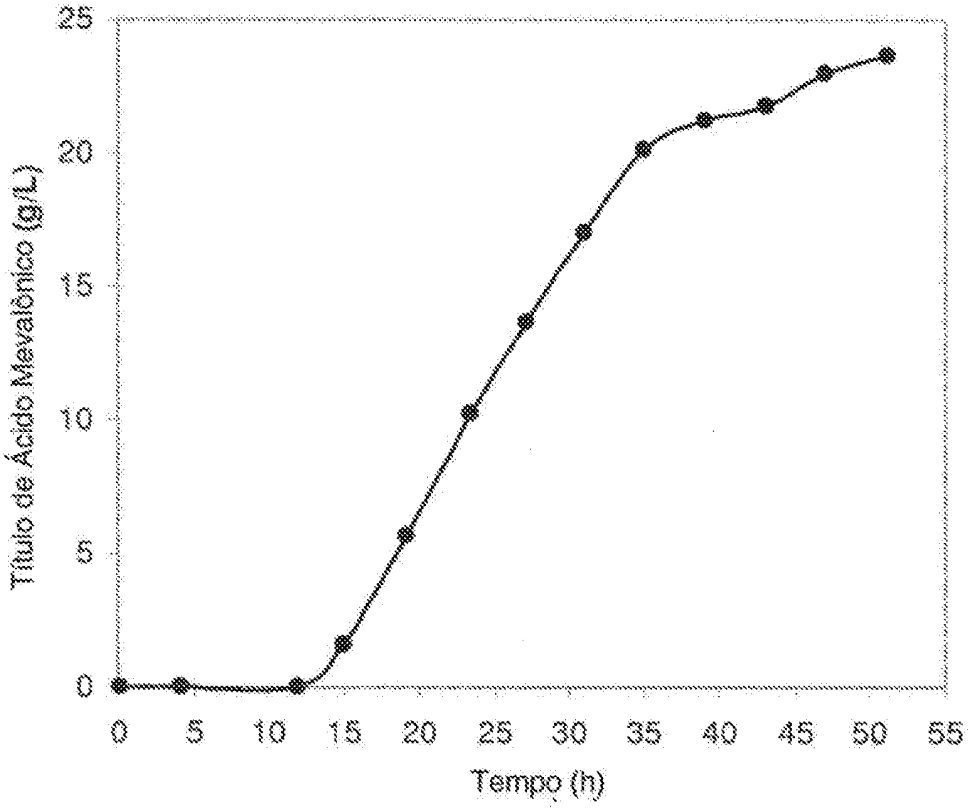

Título de Ácido Mevalônico (g/L)
25
20
15
10
5
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
Tempo (h)

Fig. 62C

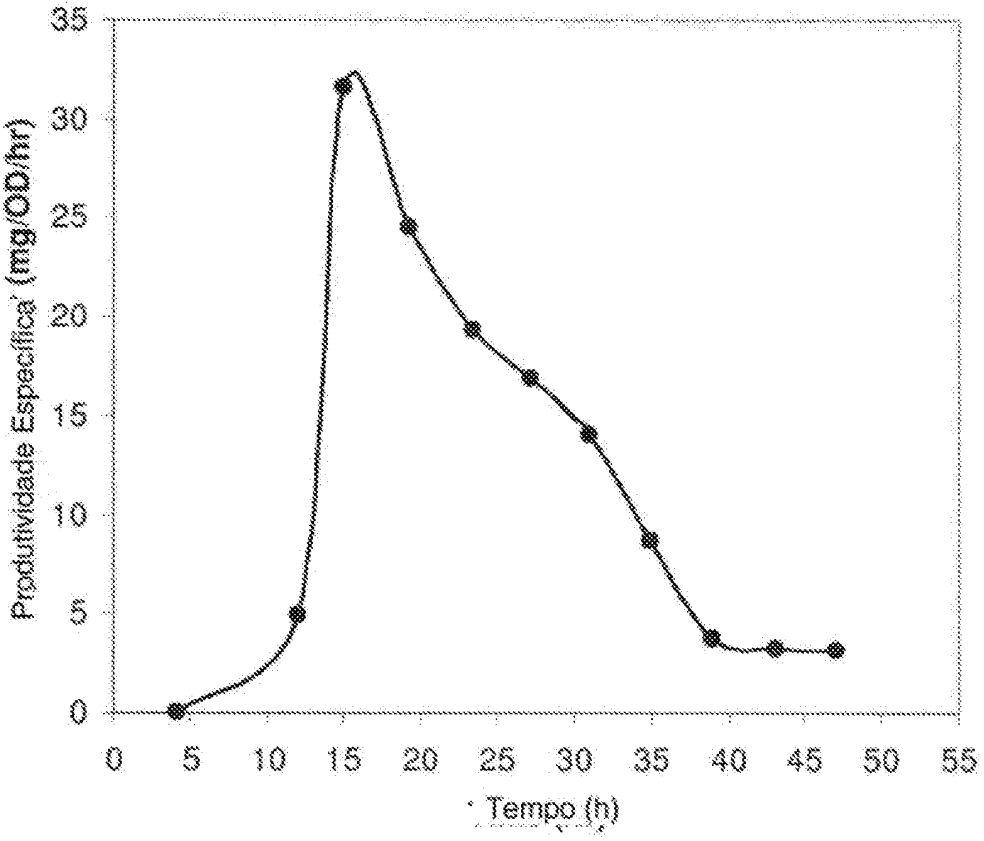

Produtividade Específica' (mg/OD/hr)
0
5
10
15
20
25
30
35
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
Tempo (h)

Fig. 63A

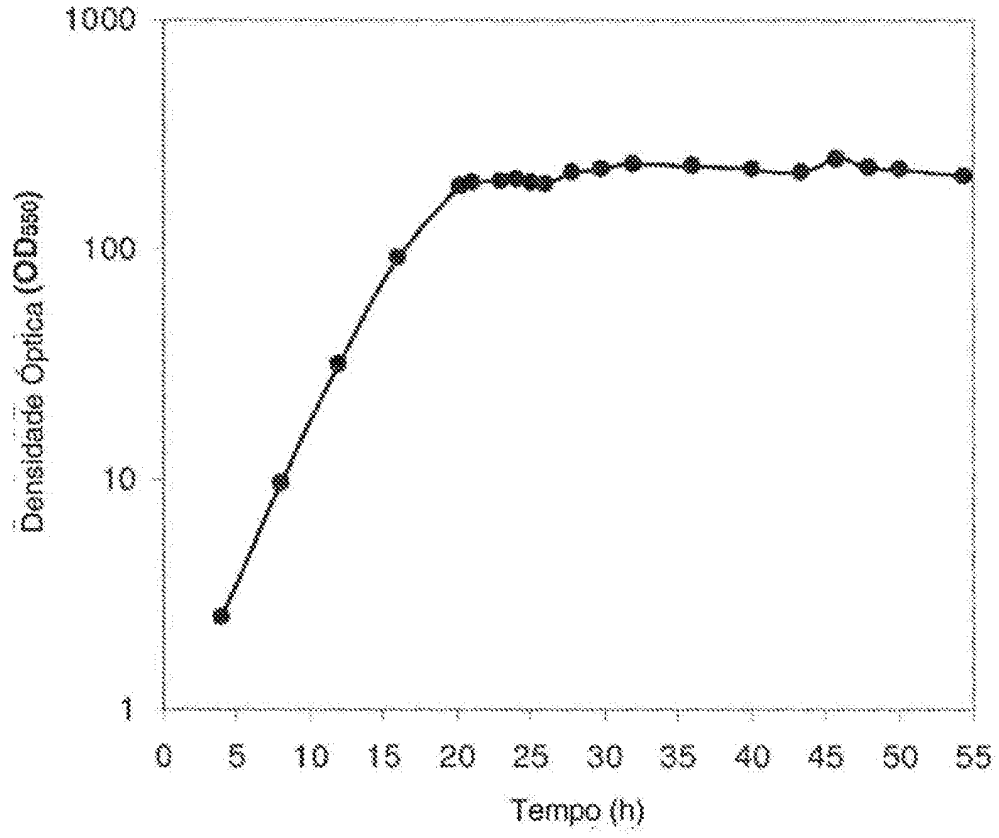

1000
100
10
1
Densidade Óptica (OD550)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
Tempo (h)

Fig. 63B

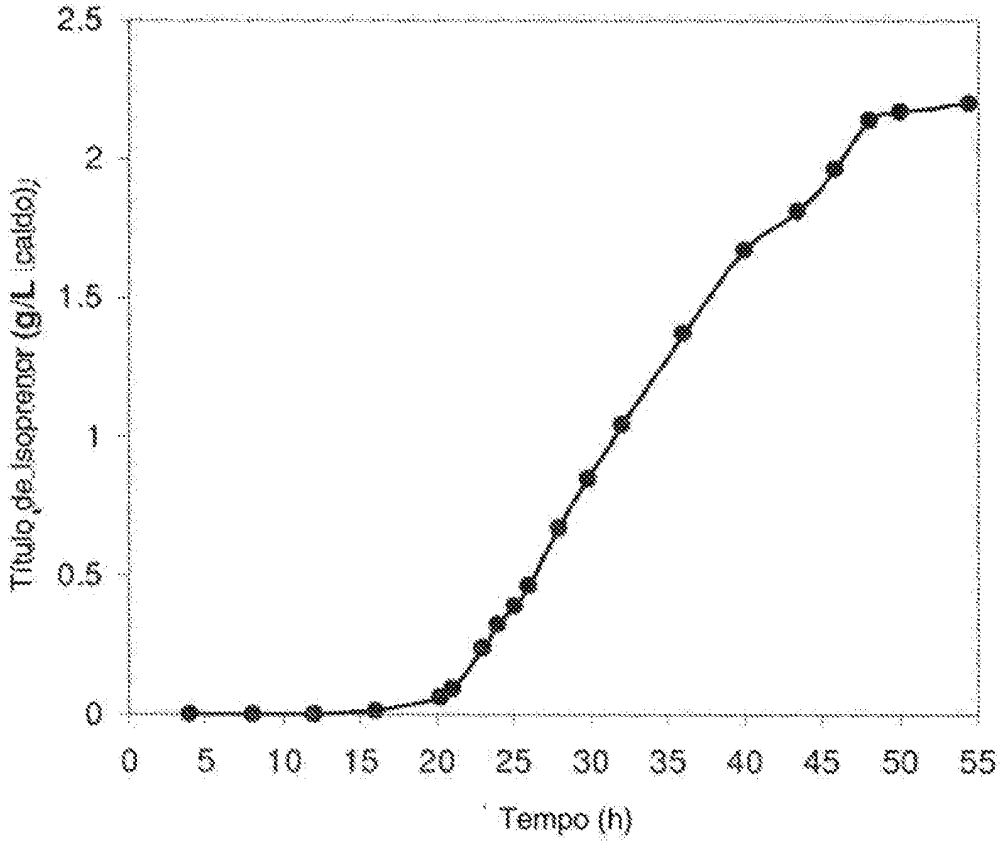

Título de Isopreno (g/L caldo)
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55
Tempo (h)

Fig. 63C

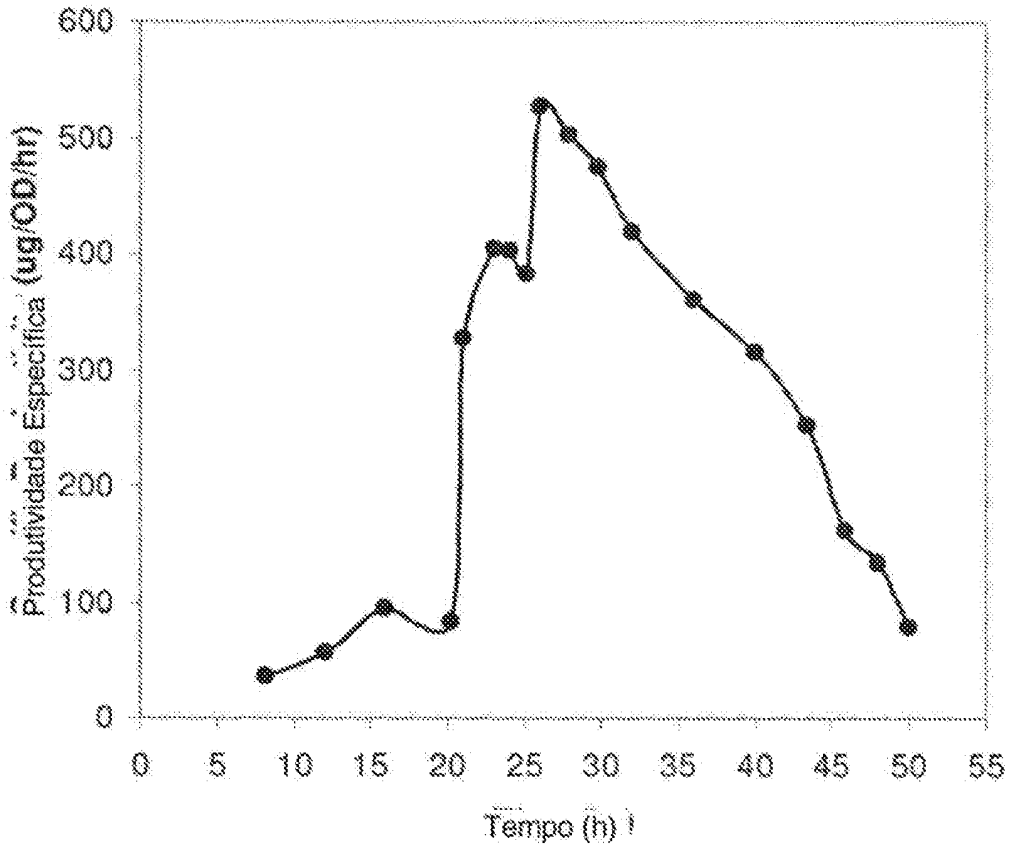

600
500
400
300
200
100
0
Produtividade Específica (ug/OD/hr)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
Tempo (h)

Fig. 64A

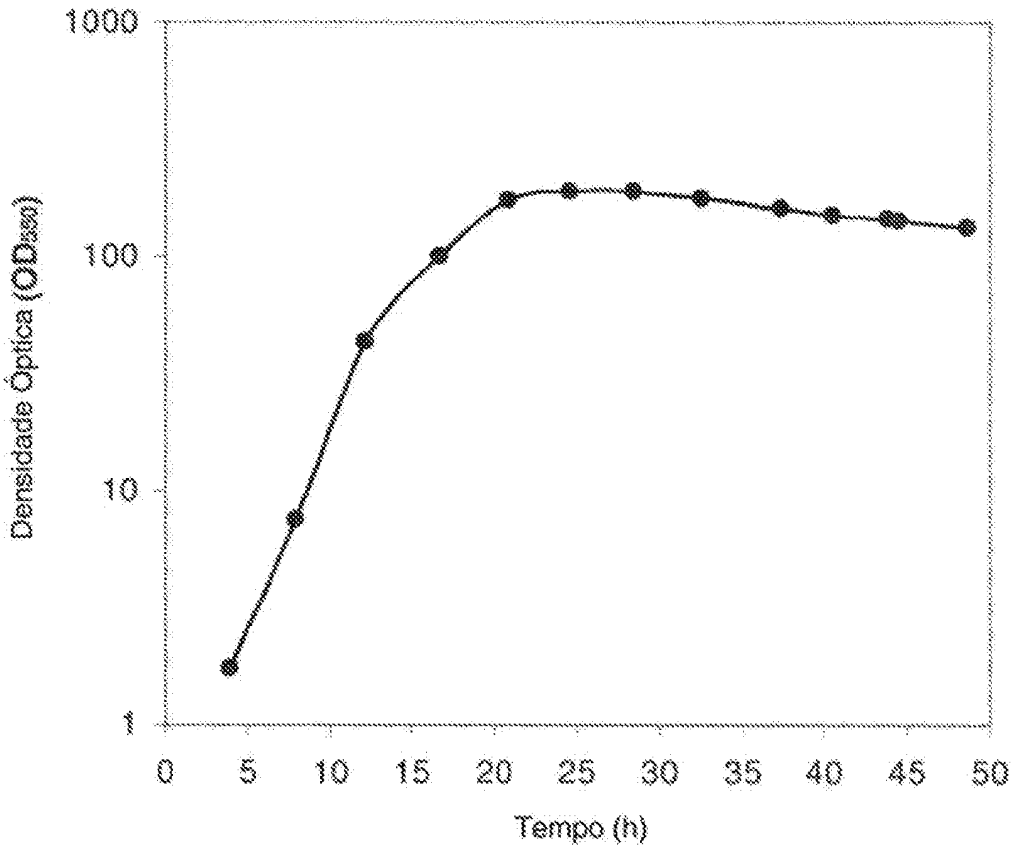

1000
100
10
1
Densidade Óptica (OD600)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
Tempo (h)

Fig. 64B

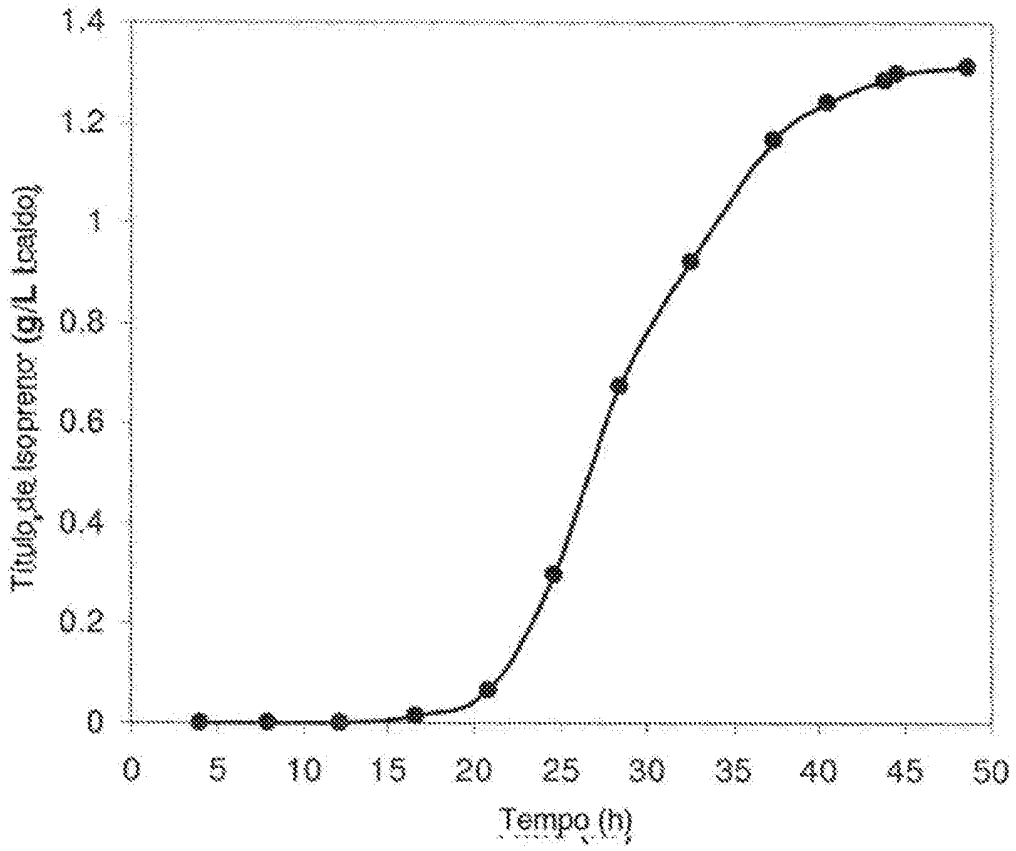

Título de isoprenol (g/L caldo)
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
Tempo (h)

Fig. 64C

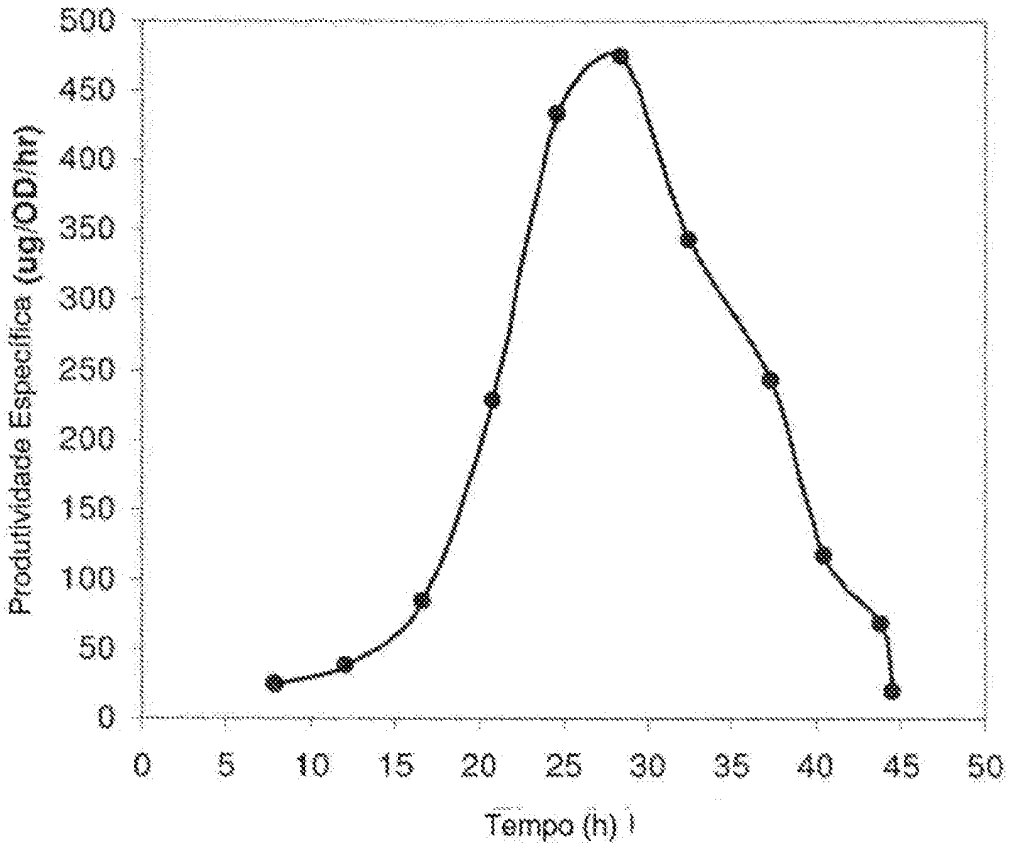

Produtividade Específica (ug/OD/hr)
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
Tempo (h)

Fig. 65A

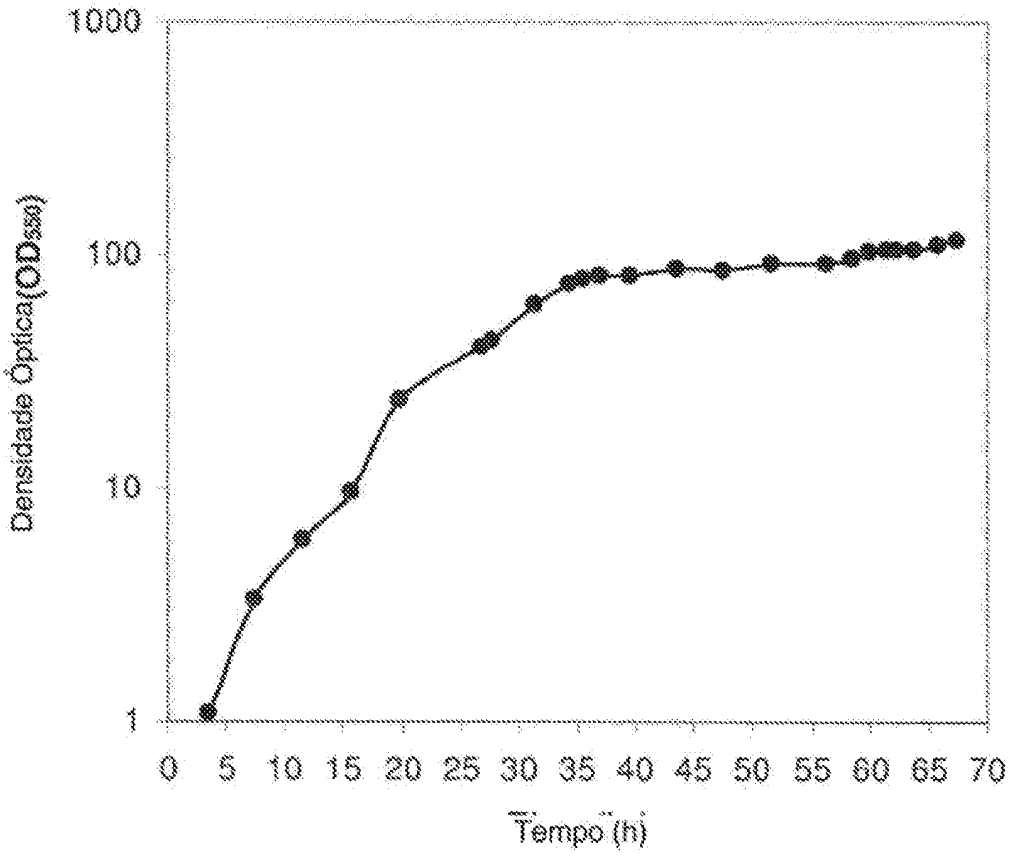

1000
100
10
1
Densidade Óptica(OD600)
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70
Tempo (h)

Fig. 65B

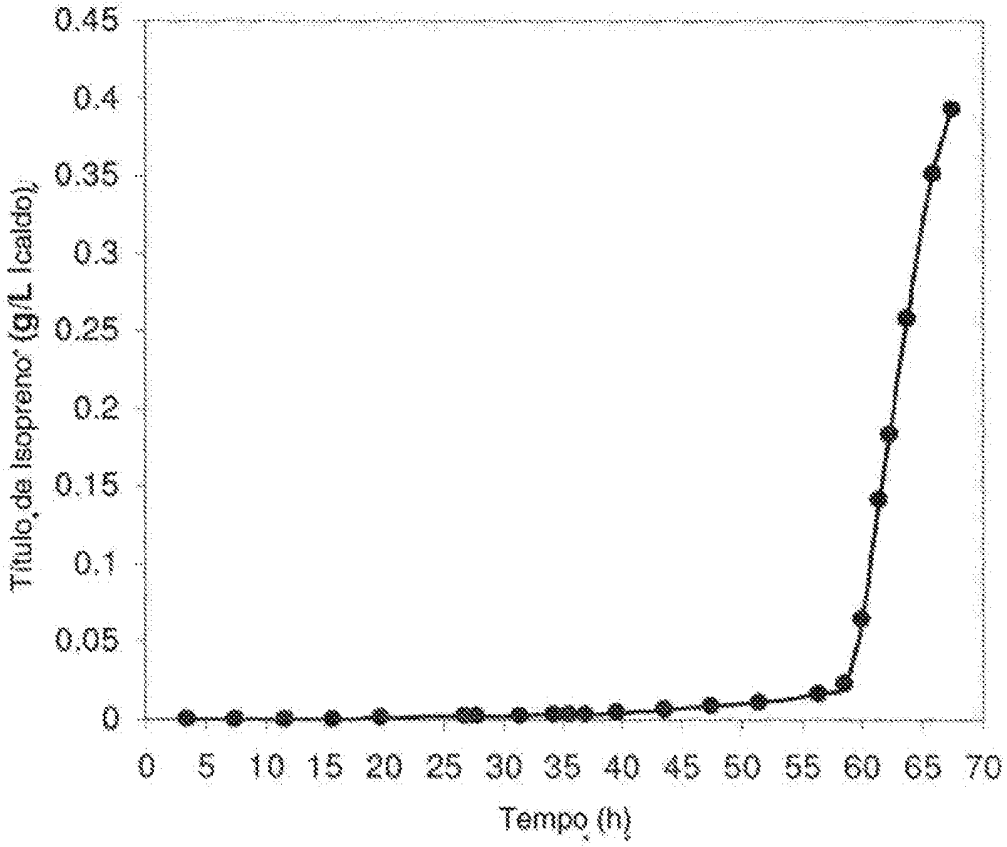

0.45
0.4
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
Título de Isopreno (g/L caldo)
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70
Tempo (h)

Fig. 65C

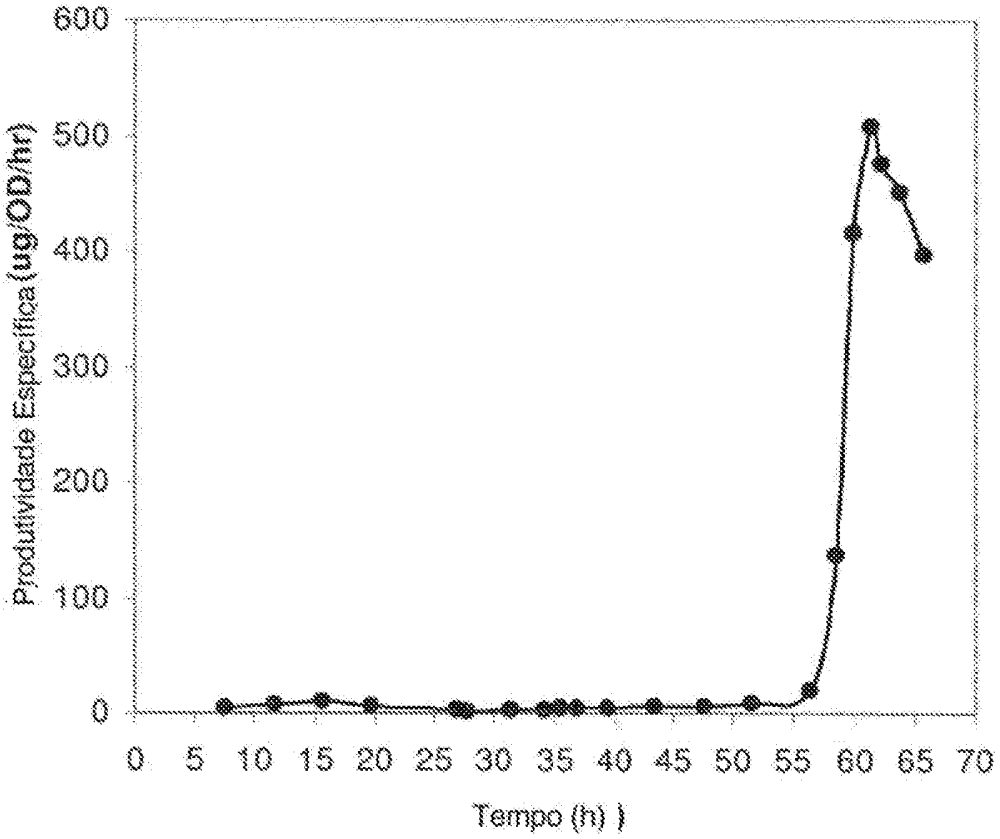

600
500
400
300
200
100
0
Produtividade Específica (ug/OD/hr)
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70
Tempo (h))

Fig. 66A

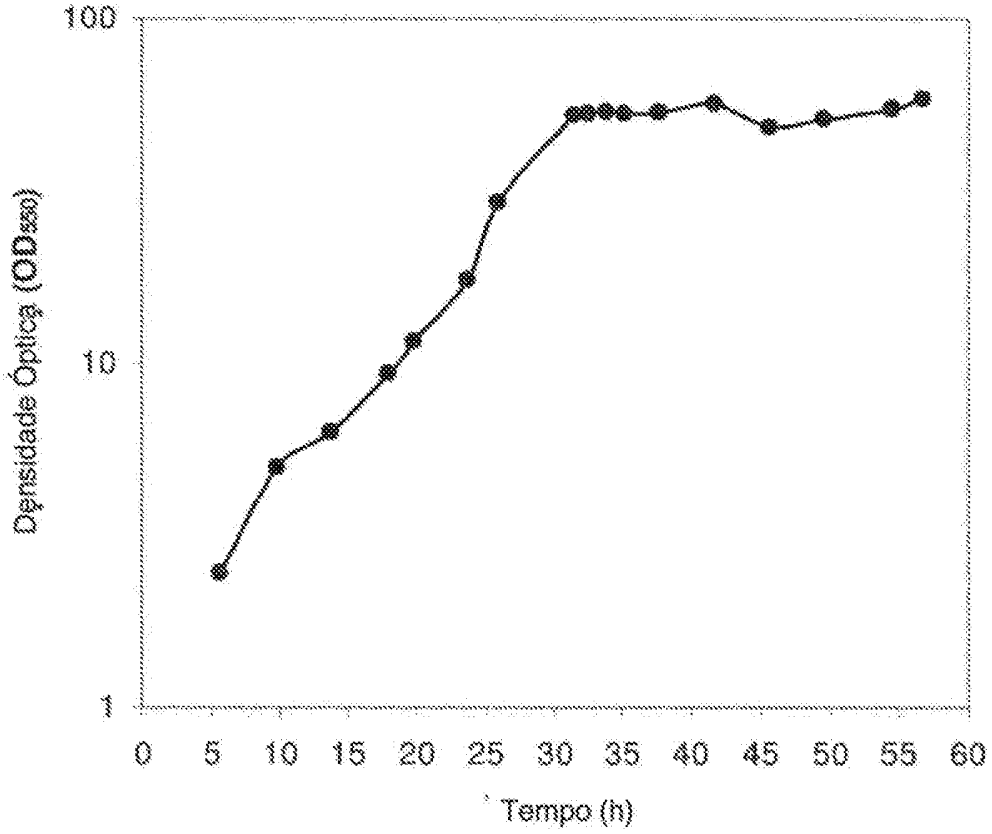

100
10
1
Densidade Óptica (OD620)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
Tempo (h)

Fig. 66B

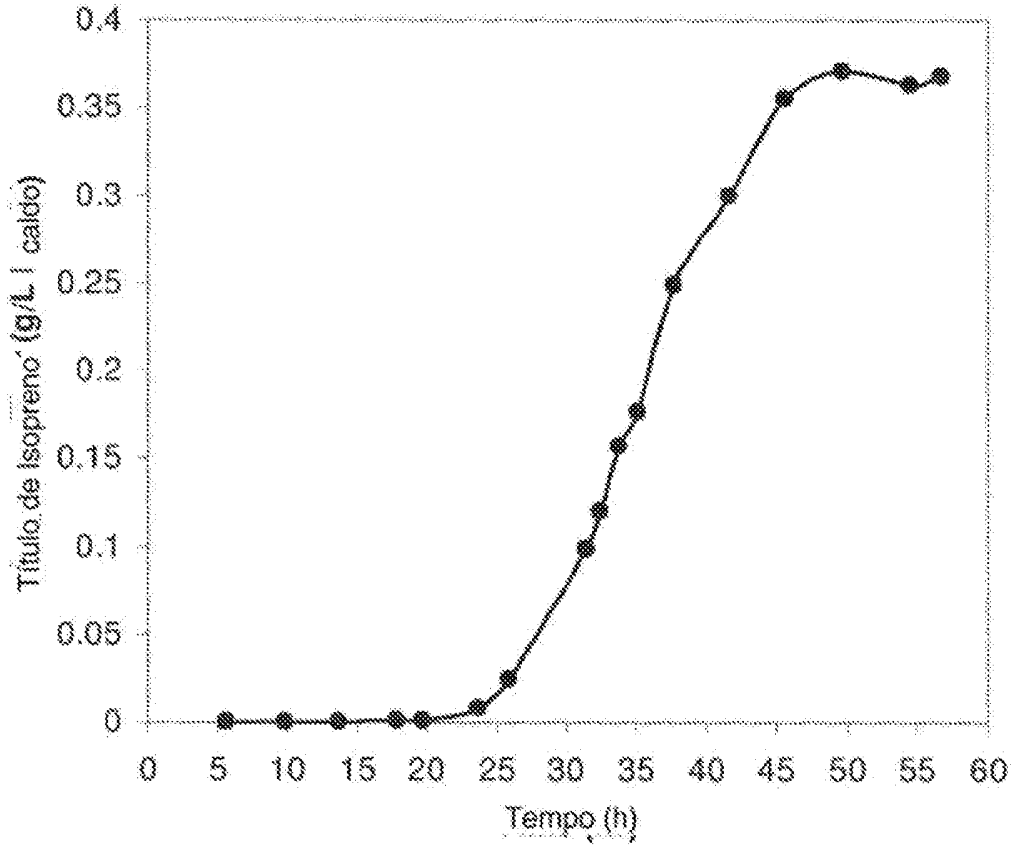

0.4
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
Título de Isopreno (g/L caldo)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
Tempo (h)

Fig. 66C

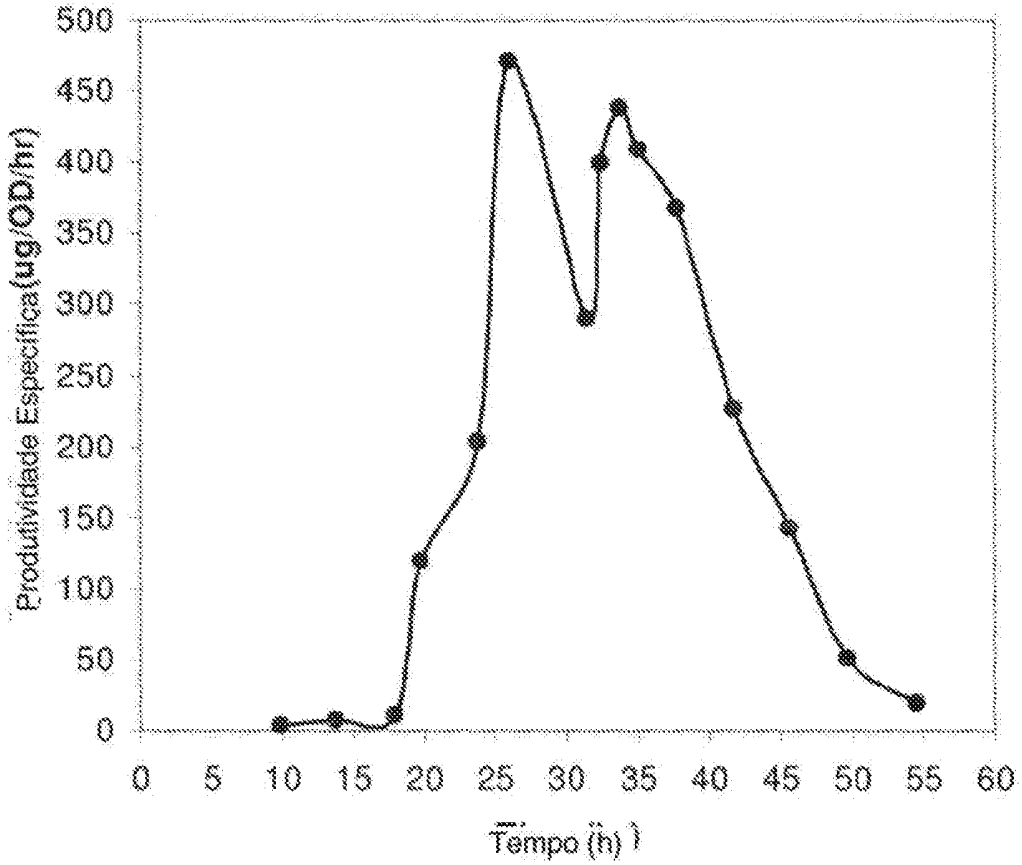

Produtividade Específica(ug/OD/hr)
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60
Tempo (h)

Fig. 67A

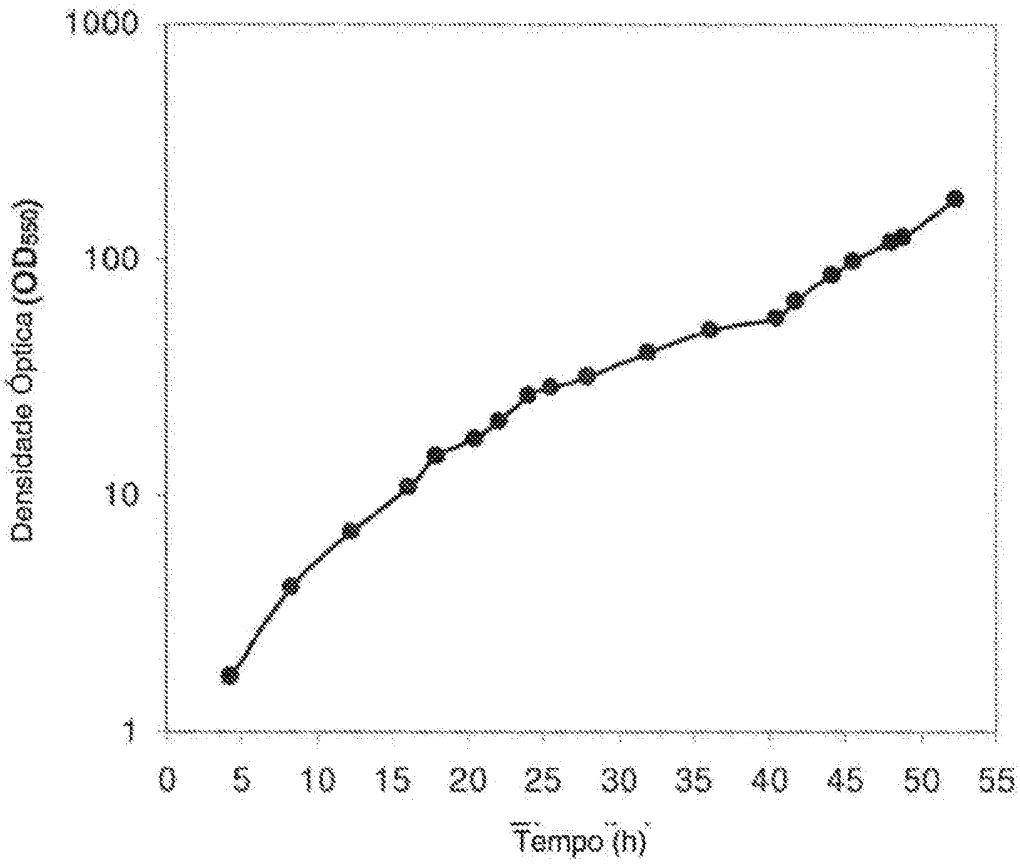

1000
100
10
1
Densidade Óptica (OD600)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
Tempo (h)

Fig. 67B

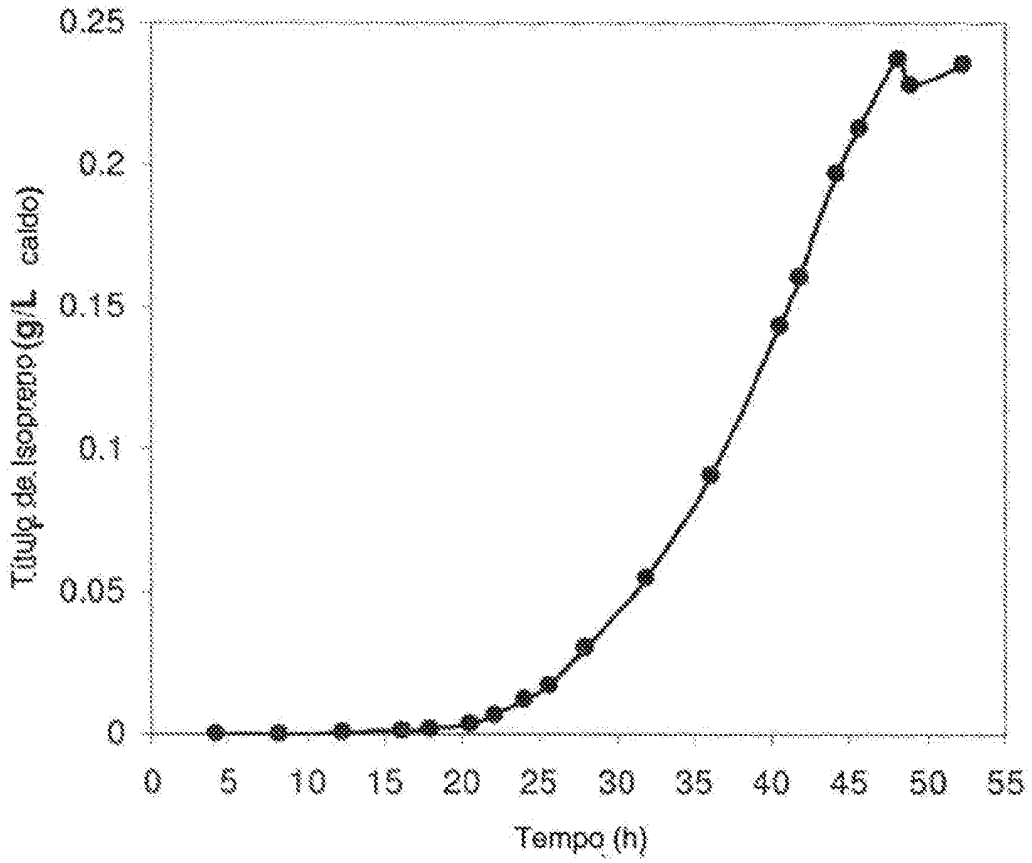

0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
Título de Isopreno (g/L caldo)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
Tempo (h)

Fig. 67C

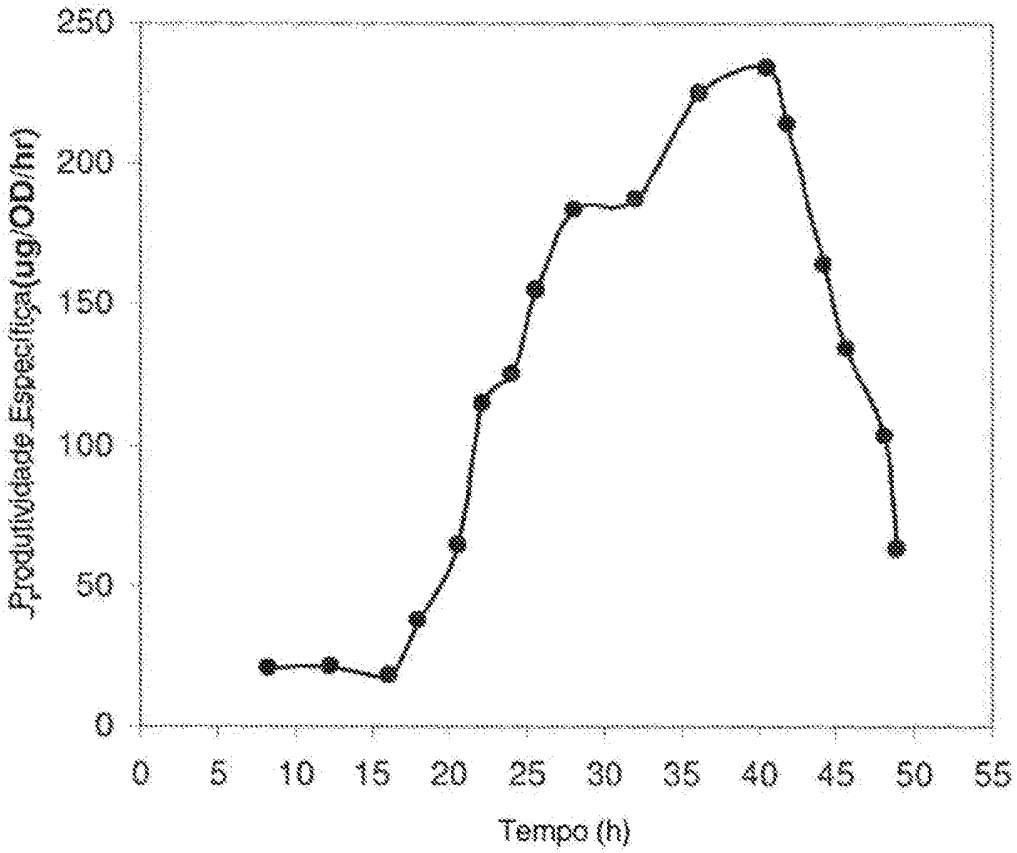

250
200
150
100
50
0
Produtividade Específica(ug/OD/hr)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
Tempo (h)

Fig. 68

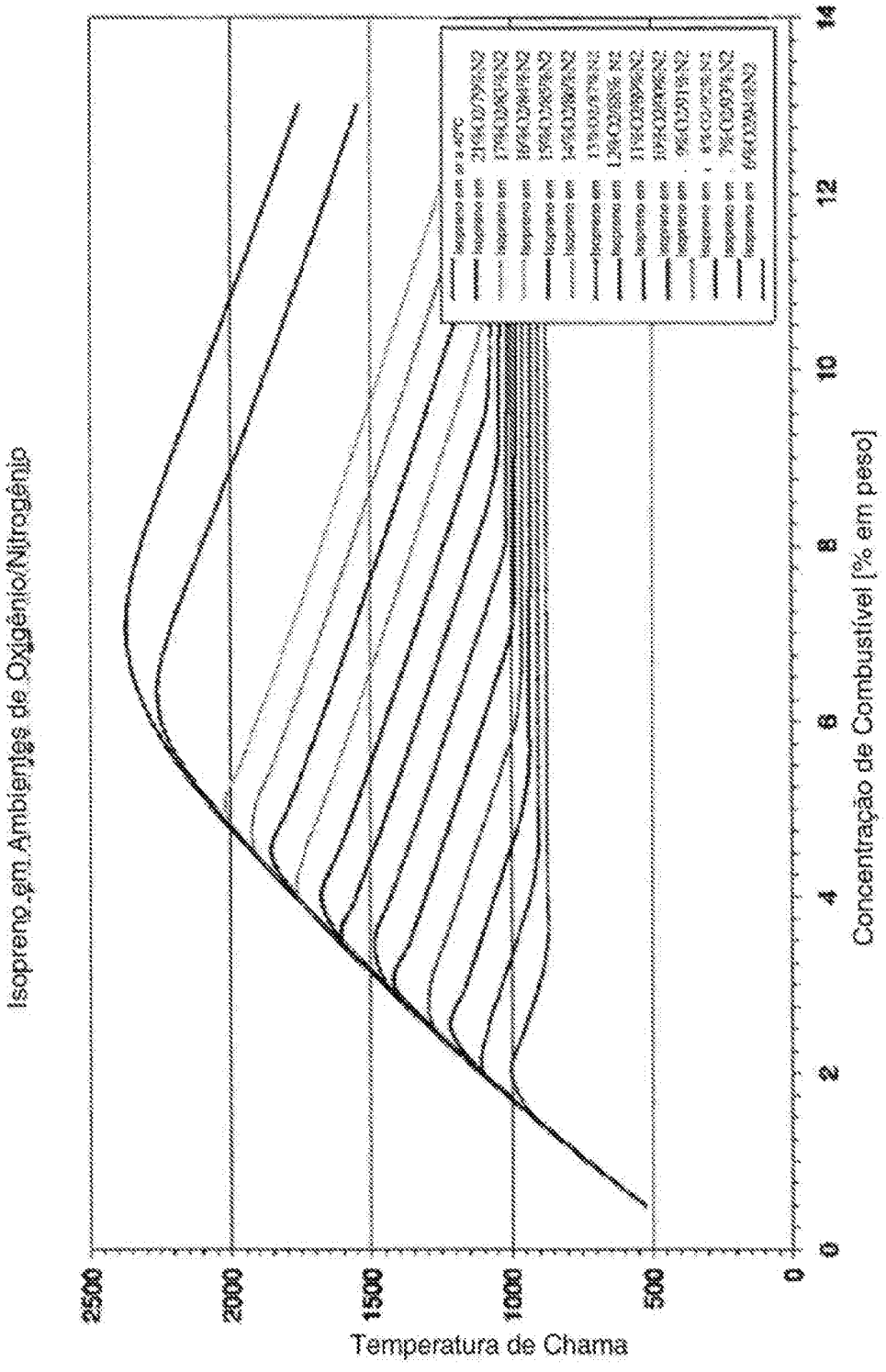

Isopreno em Ambientes de Oxigênio/Nitrogênio
Temperatura de Chama
Concentração de Combustível [% em peso]
2500
2000
1500
1000
500
0
0
2
4
6
8
10
12
14

Fig. 69

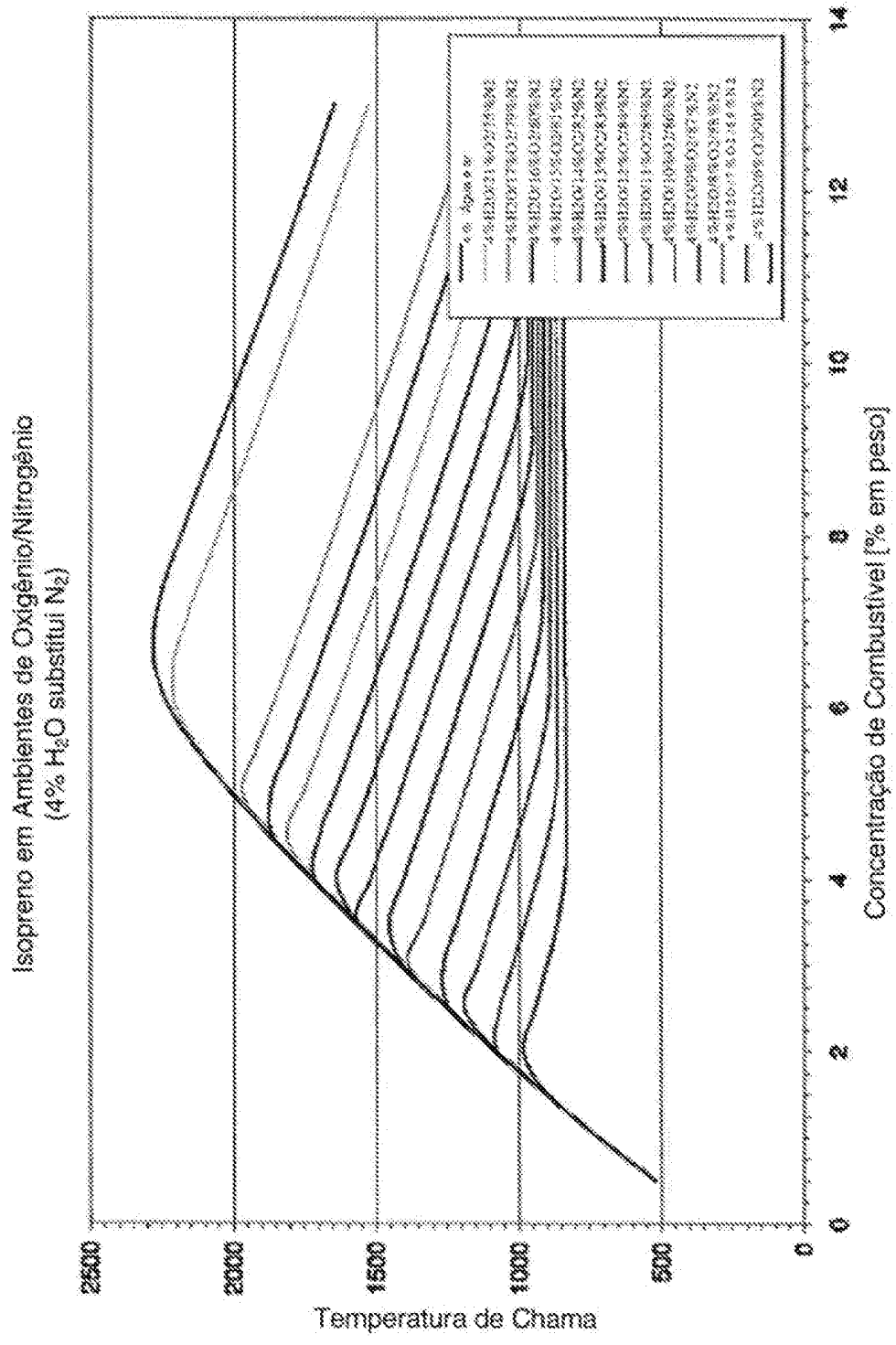

Isopreno em Ambientes de Oxigênio/Nitrogênio
(4% H_2O substitui N_2)
Temperatura de Chama
2500
2000
1500
1000
500
0
0
2
4
6
8
10
12
14
Concentração de Combustível [% em peso]

Fig. 70

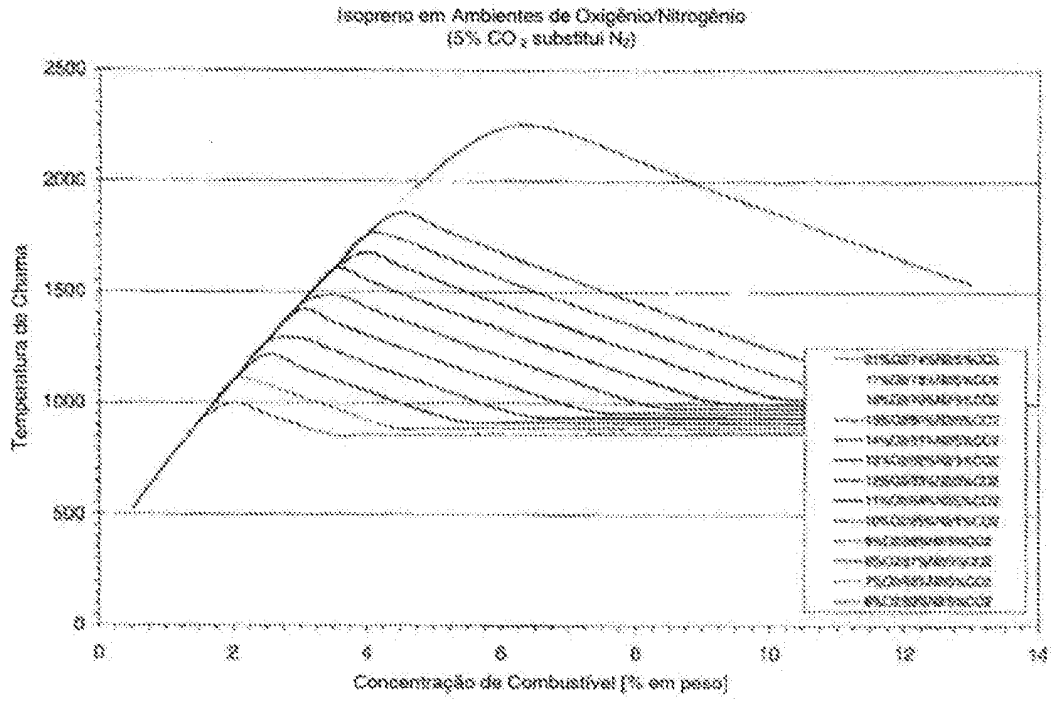

Isopreno em Ambientes de Oxigênio/Nitrogênio
(5% CO_2 substitui N_2)
Temperatura de Chama
2500
2000
1500
1000
500
0
0
2
4
6
8
10
12
14
Concentração de Combustível [% em peso]

Fig. 71

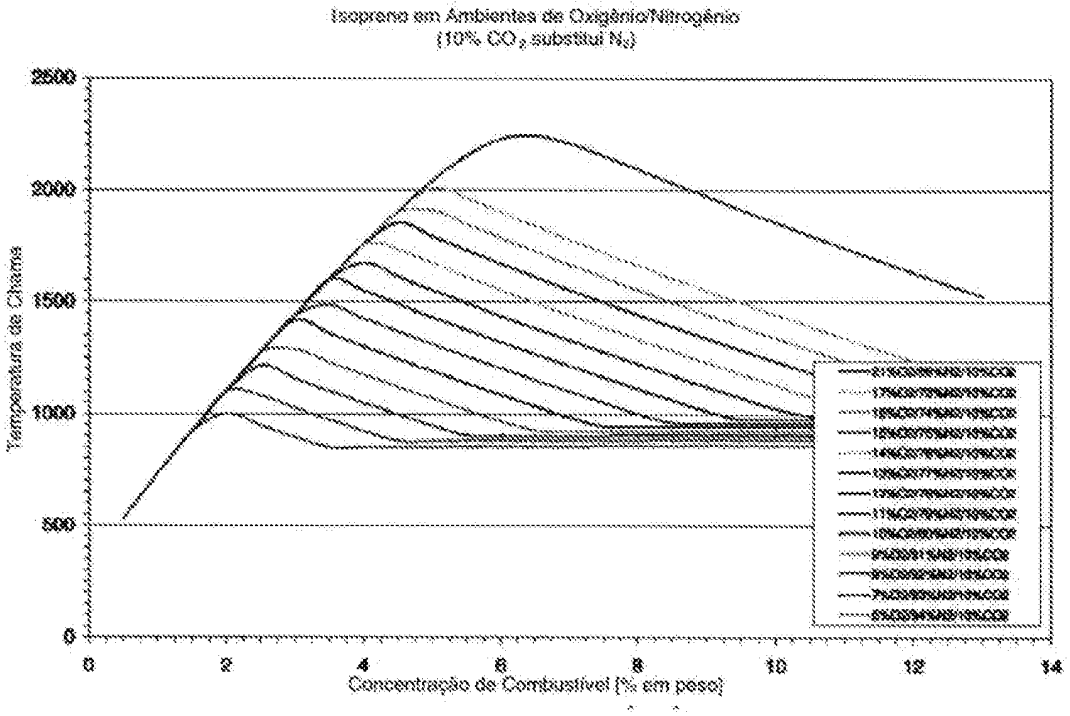

Isopreno em Ambientes de Oxigênio/Nitrogênio
(10% CO_2 substitui N_2)
Temperatura de Chama
2500
2000
1500
1000
500
0
0
2
4
6
8
10
12
14
Concentração de Combustível [% em peso]

Fig. 72

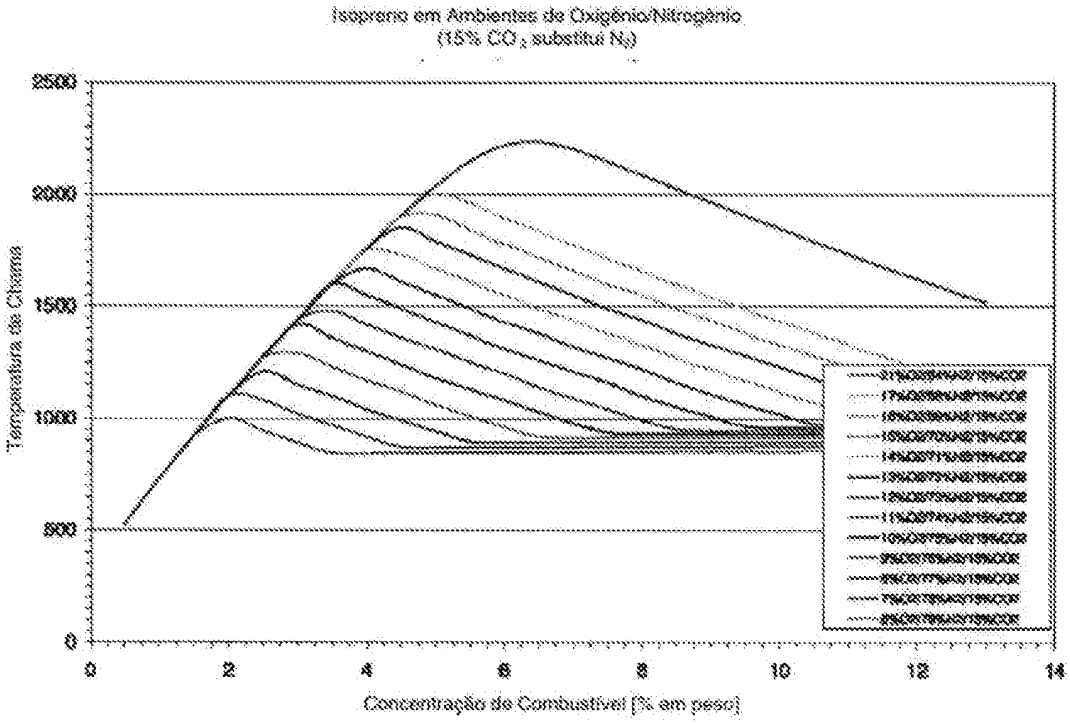

Isopreno em Ambientes de Oxigênio/Nitrogênio
(15% CO_2 substitui N_2)
Temperatura de Chama
2500
2000
1500
1000
500
0
0
2
4
6
8
10
12
14
Concentração de Combustível [% em peso]

Fig. 73

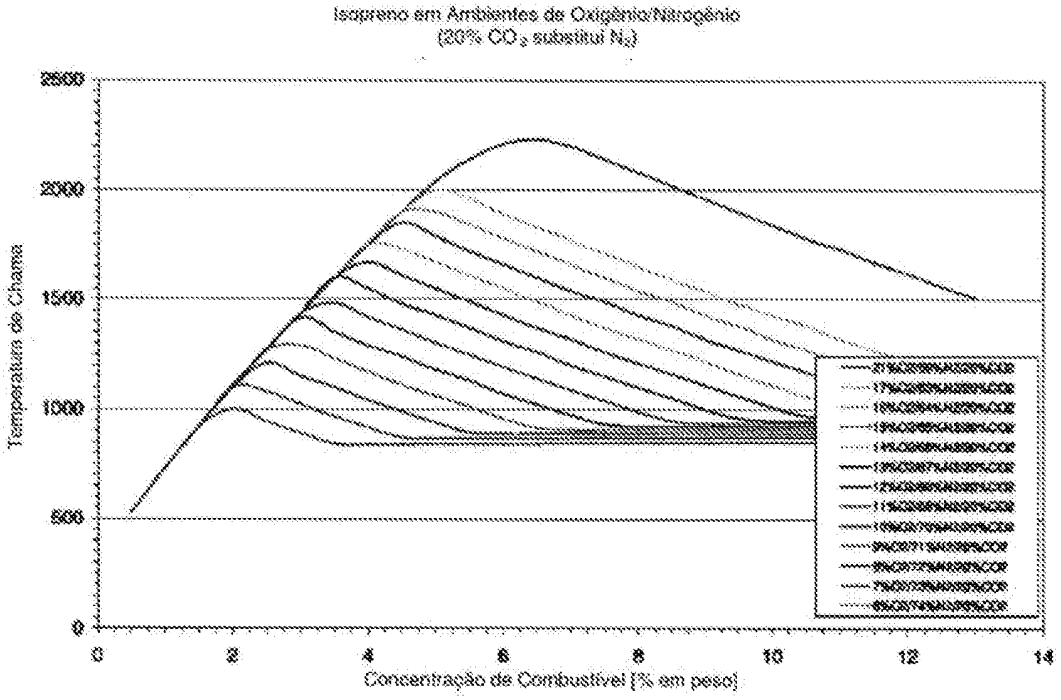

Isopreno em Ambientes de Oxigênio/Nitrogênio
(20% CO_2 substitui N_2)
Temperatura de Chama
2500
2000
1500
1000
500
0
0
2
4
6
8
10
12
14
Concentração de Combustível [% em peso]

Fig. 74

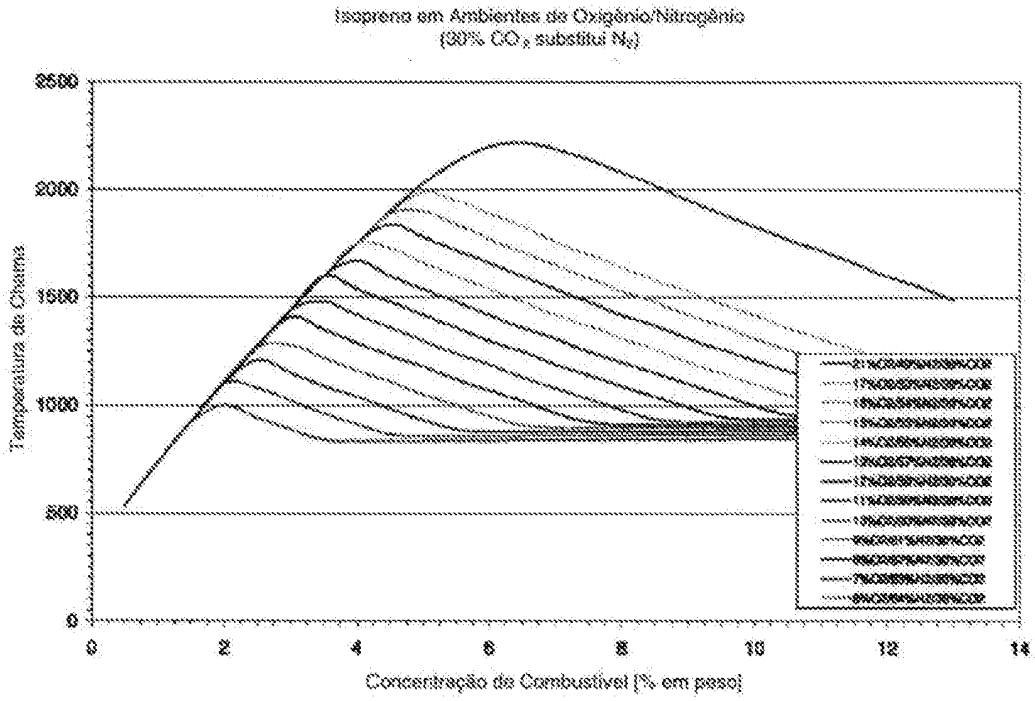

Isoprene em Ambientes de Oxigênio/Nitrogênio
(30% CO_2 substitui N_2)
Temperatura de Chama
2500
2000
1500
1000
500
0
0
2
4
6
8
10
12
14
Concentração de Combustível [% em peso]

Fig. 75A

Concentração na Deflagração																			
		Constituição Combustível		Constituição Oxidante		Concentração Molar baseada em 100g de amostra								Concentração Volumétrica baseada na lei dos gases ideais					
Concentração Combustível	Concentração Oxidante	Isopreno	H_2O	O_2	N_2	Isopreno	H_2O	O_2	N_2	Total	Isopreno	O_2	N_2	H_2O
(%vol)	(%vol)	(%vol)	(%vol)	(%vol)	(%vol)	(mol%)	(mol%)	(mol%)	(mol%)	(mol%)	(%vol)	(%vol)	(%vol)	(%vol)
3.10	96.90	100	0	12	88	4.56	0.00	36.34	304.54	345.44	1.32	10.52	88.16	0.00
3.10	96.90	100	0	13	87	4.36	0.00	39.57	301.36	345.01	1.32	11.41	87.27	0.00
3.10	96.90	100	0	14	86	4.56	0.00	42.39	297.62	344.57	1.32	12.30	86.37	0.00
3.10	96.90	100	0	15	85	4.56	0.00	45.42	294.16	344.14	1.32	13.20	85.48	0.00
3.10	96.90	100	0	16	84	4.56	0.00	48.45	290.70	343.71	1.33	14.10	84.58	0.00
3.10	96.90	100	0	17	83	4.56	0.00	51.48	287.24	343.28	1.33	15.00	83.68	0.00
3.10	96.90	100	0	21	79	4.56	0.00	63.59	273.40	341.55	1.33	18.62	80.03	0.00
3.50	96.50	100	0	11.1	88.9	5.15	0.00	33.47	306.39	345.01	1.49	9.73	88.81	0.00
4.40	95.60	100	0	12	88	6.47	0.00	35.85	300.46	342.78	1.89	10.45	87.65	0.00
5.50	94.50	100	0	13	87	8.09	0.00	38.39	293.63	340.10	2.38	11.29	86.33	0.00
6.60	93.40	100	0	14	86	9.71	0.00	40.86	286.97	337.44	2.88	12.11	85.01	0.00
7.60	92.40	100	0	15	85	11.18	0.00	43.31	280.30	334.99	3.34	12.93	83.73	0.00
8.50	91.50	100	0	16	84	12.50	0.00	45.75	274.50	332.75	3.76	13.75	82.49	0.00
9.60	90.40	100	0	17	83	14.12	0.00	48.03	267.97	330.11	4.28	14.65	81.18	0.00
13.50	86.50	100	0	21	79	19.93	0.00	56.77	244.85	320.67	6.16	17.70	76.11	0.00

Fig. 75B

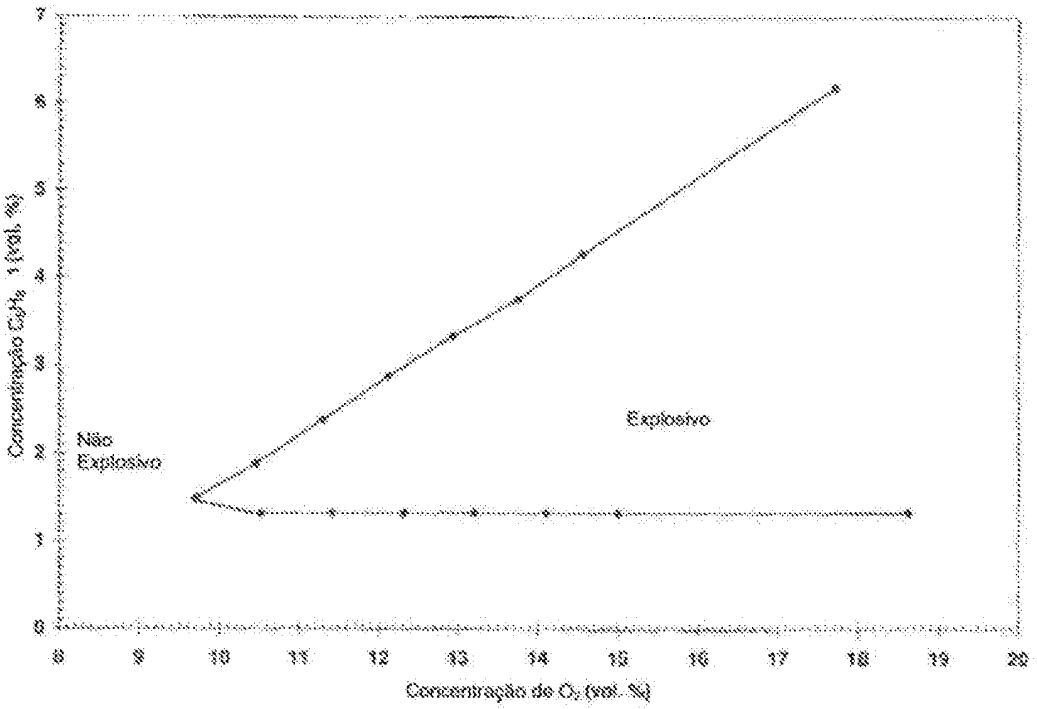


Fig. 76A

Concentração na Deflagração																				
		Constituição Combustível	Constituição Oxidante			Concentração Molar baseada em 100g de amostra							Concentração Volumétrica baseada na lei dos gases ideais							
Fuel Conc. (%vol)	Oxidizer Conc. (%vol)	Isopreno (%vol)	H_2O (%vol)	O_2 (%vol)	N_2 (%vol)	Isopreno (mols)	H_2O (mols)	O_2 (mols)	N_2 (mols)	Total (mols)	Isopreno (%vol)	O_2 (%vol)	N_2 (%vol)	H_2O (%vol)						
3.252	96.748	100	4	12	84	4.76	21.50	26.28	240.24	292.81	1.36	10.28	82.27	6.09						
3.274	96.726	100	4	13	83	4.81	21.48	29.20	236.72	292.22	1.37	11.15	81.36	6.12						
3.290	96.710	100	4	14	82	4.84	21.48	42.31	233.22	291.86	1.38	12.02	80.49	6.11						
3.288	96.712	100	4	15	81	4.84	21.49	43.83	229.77	291.43	1.38	12.90	79.61	6.12						
3.286	96.714	100	4	16	80	4.83	21.49	46.36	226.33	291.01	1.38	13.78	78.72	6.12						
3.284	96.716	100	4	17	79	4.83	21.48	51.38	222.83	290.58	1.38	14.66	77.84	6.13						
3.276	96.724	100	4	21	75	4.82	21.48	63.48	209.08	348.87	1.38	18.19	74.29	6.16						
3.500	96.500	100	4	11.3	84.5	5.15	21.44	34.68	231.32	292.49	1.45	9.84	82.52	6.18						
4.200	95.800	100	4	12	84	6.18	21.29	29.93	287.40	330.79	1.76	10.24	81.93	6.07						
6.800	94.700	100	4	13	83	7.79	21.04	38.47	280.72	348.03	2.24	11.05	83.66	6.05						
6.400	93.600	100	4	14	82	8.41	20.80	40.95	274.11	345.28	2.73	11.86	79.39	6.02						
7.400	92.600	100	4	15	81	10.86	20.58	49.41	267.88	342.74	3.18	12.68	78.16	6.00						
8.500	91.500	100	4	16	80	12.50	20.33	45.75	261.43	340.01	3.68	13.46	76.69	5.98						
9.400	90.600	100	4	17	79	13.82	20.13	48.13	255.62	337.71	4.08	14.25	75.68	5.98						
13.300	86.700	100	4	21	75	19.58	19.27	56.80	232.23	327.85	5.96	17.35	70.81	5.87						

Fig. 76B

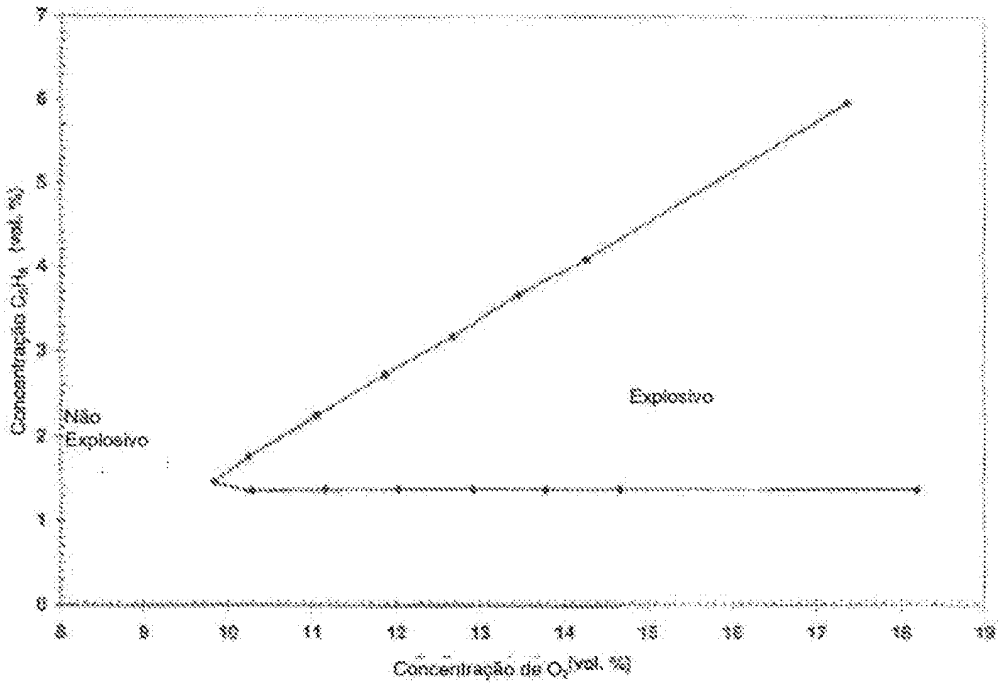
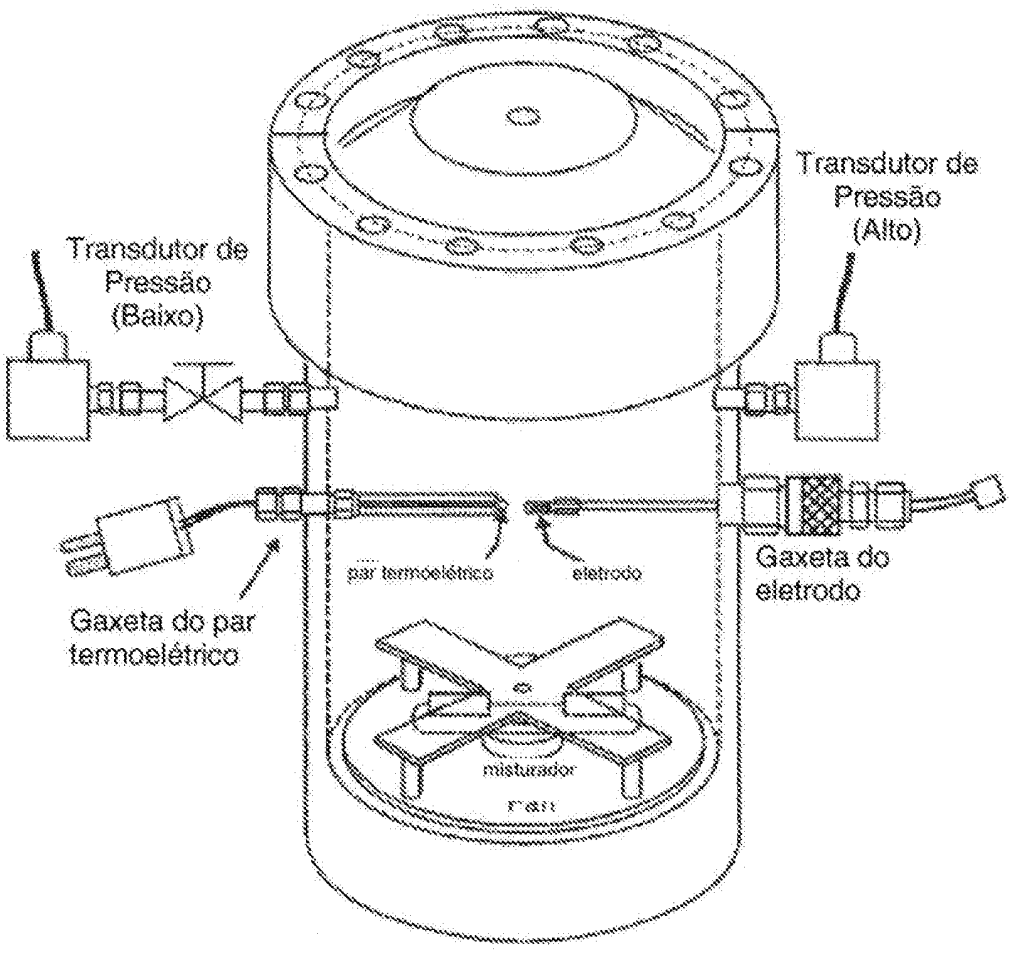


Fig. 77


Transdutor de Pressão (Alto)
Transdutor de Pressão (Baixo)
par termoelétrico
eletrodo
Gaxeta do eletrodo
Gaxeta do par termoelétrico
misturador

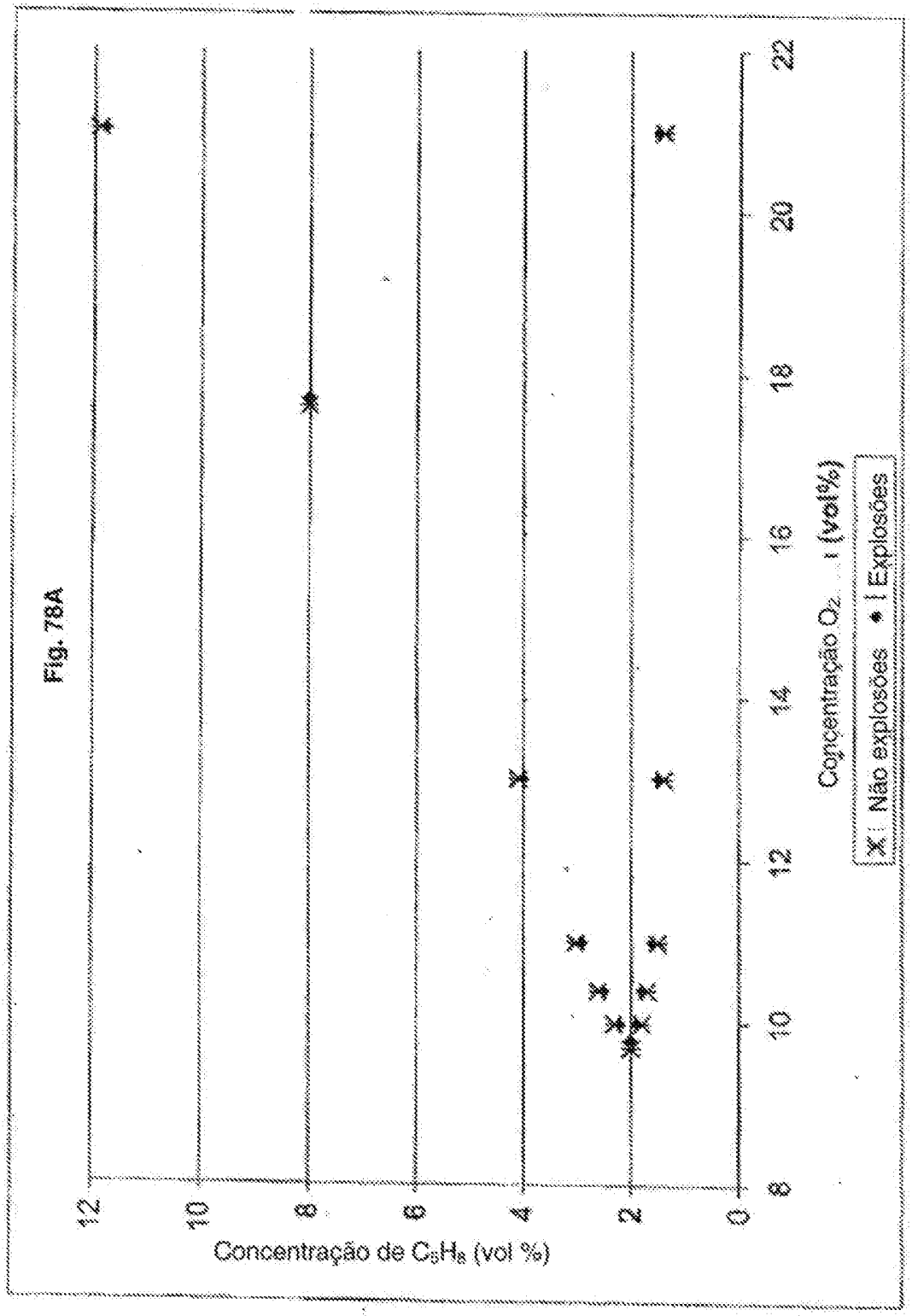
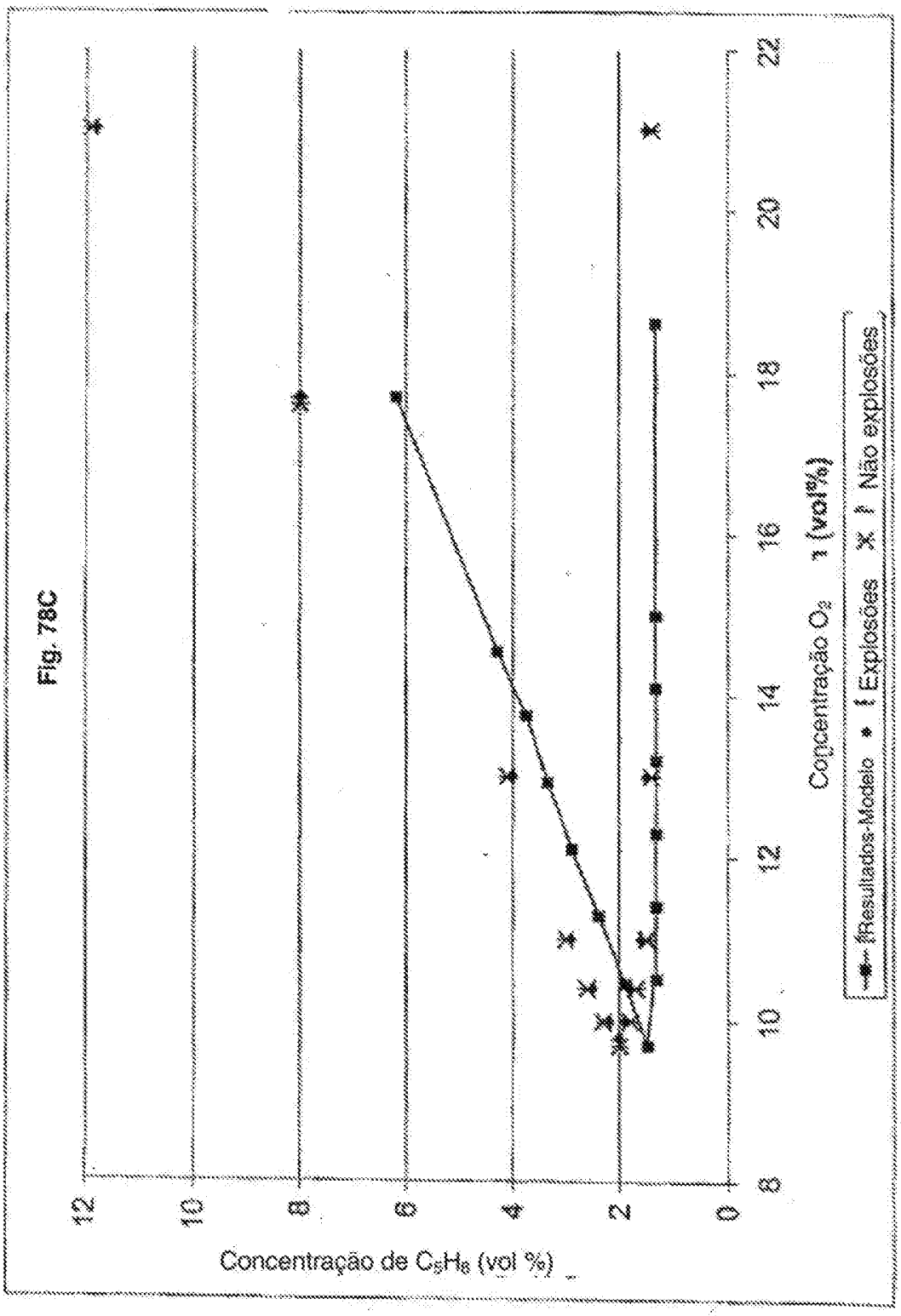

Fig. 78A
Concentração de C_3H_8 (vol %)
0
2
4
6
8
10
12
8
10
12
14
16
18
20
22
Concentração O_2 (vol%)
X : Não explosões • : Explosões

Fig. 78B

Explosões		Não Explosões	
Concentração de O_2	Concentração de C_3H_8	Concentração de O_2	Concentração de C_3H_8
(vol. %)	(vol. %)	(vol. %)	(vol. %)
21.0	1.5	21.0	1.4
13.0	1.5	13.0	1.4
11.0	1.6	11.0	1.5
10.4	1.8	10.4	1.7
10.0	1.9	10.0	1.8
9.8	2	9.7	2
10.0	2.2	10.0	2.3
10.4	2.5	10.4	2.6
11.0	3.9	11.0	3.0
13.0	4.0	13.0	4.1
17.7	8.0	17.6	8.0
21.0	11.8	21.0	11.9


Fig. 78C
Concentração de C_5H_8 (vol %)
12
10
8
6
4
2
0
8
10
12
14
16
18
20
22
Concentração O_2 (vol%)
Resultados-Modelo
Explosões
Não explosões

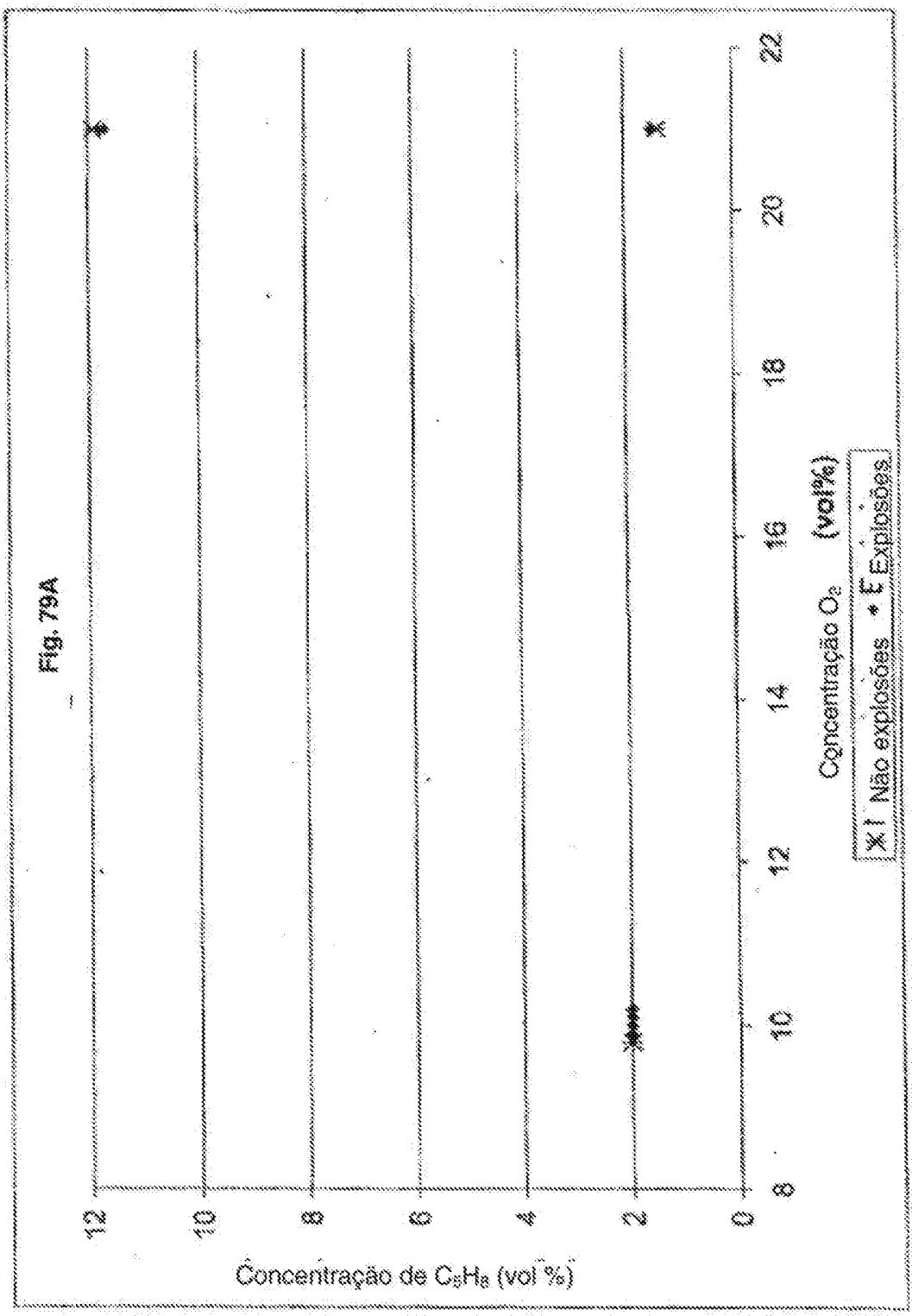

Fig. 79A
Concentração de C_5H_8 (vol %)
0
2
4
6
8
10
12
8
10
12
14
16
18
20
22
Concentração O_2 (vol%)
Não explosões
Explosões

Fig. 79B

Explosões		Não Explosões	
Concentração de O_2 (vol. %)	Concentração de C_3H_8 (vol. %)	Concentração de O_2 (vol. %)	Concentração de C_3H_8 (vol. %)
21.0	11.7	21.0	11.9
21.0	11.8	21.0	11.9
21.0	11.8	21.0	11.9
21.0	1.5	21.0	1.4
21.0	1.5	21.0	1.4
10.2	2.0	21.0	1.4
10.1	2.0	9.8	2.0
10.0	2.0	9.8	2.0
9.9	2.0	9.8	2.0

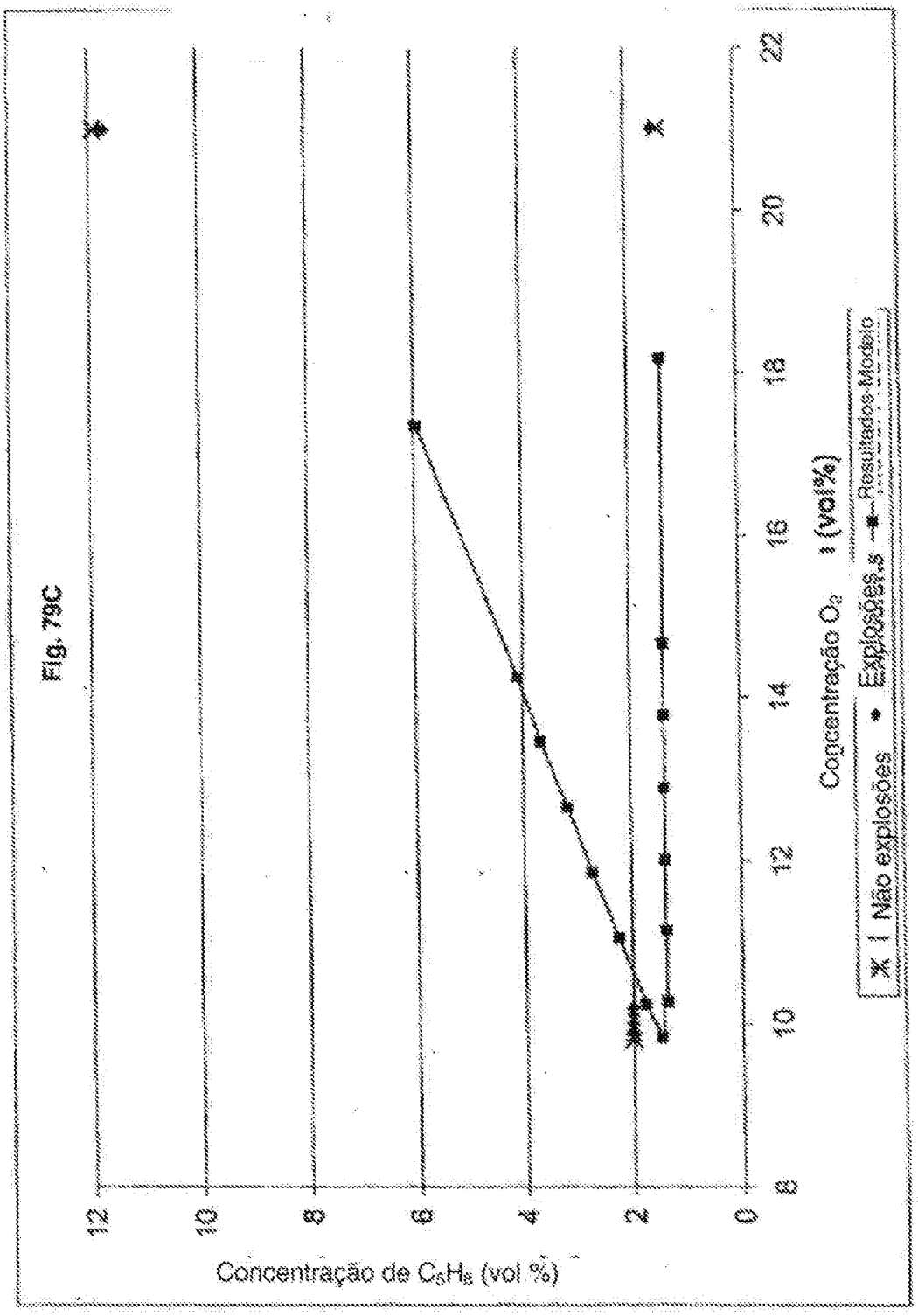

Fig. 79C
Concentração de C_5H_8 (vol %)
Concentração O_2 (vol%)
0
2
4
6
8
10
12
8
10
12
14
16
18
20
22
X Não explosões
Explosões
Resultados Modelo

Fig. 80A

Série de testes 1

Teste	Nome Arquivo	Temp °C	Pressão Inicial bara	Pressões Parciais C_2H_6 mbar	Pressões Parciais N_2 mbar	Pressões Parciais O_2 mbar	Concentrações C_2H_6 vol. %	Concentrações N_2 vol. %	Concentrações O_2 vol. %	Resultado (Non-Explosion=Não Explosão e Explosion=Explosão)	Pex bara
1	T11120700	40	1.012	12	787	213	1.2	77.8	21.0	Non-Explosion	1.05
2	T11120701	40	1.016	16	787	213	1.6	77.5	21.0	Explosion	5.5
3	T11120702	40	1.015	14	788	213	1.4	77.6	21.0	Non-Explosion	<1.02
4	T11120703	40	1.014	15	786	213	1.5	77.5	21.0	Non-Explosion	<1.02
5	T11120704	40	1.014	15	786	213	1.5	77.5	21.0	Explosion	4.31
6	T11120705	40	1.017	18	785	214	1.8	77.2	21.0	Explosion	5.47
7	T11120706	40	1.014	15	786	213	1.5	77.5	21.0	Explosion	4.51
8	T11120707	40	1.014	14	787	213	1.4	77.6	21.0	Non-Explosion	<1.02
9	T11120708	40	1.014	14	787	213	1.4	77.6	21.0	Non-Explosion	1.05
10	T11120709	40	1.015	102	700	213	10.0	69.0	21.0	Explosion	1.45
11	T11120710	40	1.014	102	699	213	10.1	68.9	21.0	Explosion	1.39
12	T11120711	40	1.014	105	695	213	10.5	68.5	21.0	Explosion	1.34
13	T11120712	40	1.014	113	688	213	11.1	67.9	21.0	Explosion	1.29
14	T11120713	40	1.014	122	679	213	12.0	67.0	21.0	Non-Explosion	<1.02
15	T11120714	40	1.014	117	684	213	11.5	67.5	21.0	Explosion	1.32
16	T11120715	40	1.014	120	681	213	11.8	67.2	21.0	Non-Explosion	1.09
17	T11120700	40	1.014	120	681	213	11.8	67.2	21.0	Explosion	1.09
18	T11130701	40	1.014	121	680	213	11.9	67.1	21.0	Non-Explosion	1.07
19	T11130702	40	1.015	121	681	213	11.9	67.1	21.0	Non-Explosion	1.08
20	T11130703	40	1.015	121	681	213	11.9	67.1	21.0	Non-Explosion	1.07
21	T11130704	40	1.015	30	853	132	3.0	84.0	13.0	Explosion	1.61
22	T11130705	40	1.014	36	846	132	3.6	83.4	13.0	Explosion	1.28
23	T11130706	40	1.014	39	843	132	3.8	83.1	13.0	Explosion	1.12
24	T11130707	40	1.015	41	842	132	4.0	83.0	13.0	Explosion	1.09
25	T11130708	40	1.014	42	840	132	4.1	82.9	13.0	Non-Explosion	1.06
26	T11130709	40	1.015	42	841	132	4.1	82.9	13.0	Non-Explosion	1.08
27	T11130710	40	1.014	42	840	132	4.1	82.8	13.0	Non-Explosion	1.06
28	T11130711	40	1.014	15	867	132	1.5	85.5	13.0	Non-Explosion	1.03
29	T11130712	40	1.014	16	866	132	1.6	85.4	13.0	Explosion	4.81
30	T11130713	40	1.014	15	867	132	1.5	85.5	13.0	Explosion	4
31	T11130714	40	1.014	14	868	132	1.4	85.6	13.0	Non-Explosion	1.03
32	T11130715	40	1.014	14	868	132	1.4	85.6	13.0	Non-Explosion	<1.02
33	T11130716	40	1.014	14	868	132	1.4	85.6	13.0	Non-Explosion	1.03
34	T11130717	40	1.015	20	883	112	2.0	87.0	11.0	Explosion	1.7
35	T11130718	40	1.014	28	874	112	2.8	86.2	11.0	Non-Explosion	1.06
36	T11130719	40	1.014	28	874	112	2.8	86.2	11.0	Non-Explosion	1.06
37	T11130720	40	1.014	28	874	112	2.8	86.2	11.0	Explosion	1.13
38	T11130721	40	1.015	29	874	112	2.9	86.1	11.0	Non-Explosion	1.08
39	T11130722	40	1.014	29	873	112	2.9	86.1	11.0	Explosion	1.1

Fig. 80B

Teste	Nome Arquivo	Temp °C	Pressão Inicial a bara	Pressões Parciais C_3H_8 mbar	N_2 mbar	O_2 mbar	Concentrações C_3H_8 vol. %	N_2 vol. %	O_2 vol. %	Resultado	Pex bara
40	T11130723	40	1.014	30	872	112	3.0	86.0	11.0	Non-Explosion	1.06
41	T11130724	40	1.014	30	872	112	3.0	86.0	11.0	Non-Explosion	1.05
42	T11130725	40	1.014	30	872	112	3.0	86.0	11.0	Non-Explosion	1.05
43	T11130726	40	1.014	18	887	112	1.8	87.5	11.0	Non-Explosion	<1.02
44	T11130727	40	1.014	15	887	112	1.5	87.5	11.0	Non-Explosion	<1.02
45	T11140700	40	1.014	18	885	112	1.8	87.4	11.0	Non-Explosion	<1.02
46	T11140701	40	1.014	17	885	112	1.7	87.3	11.0	Explosion	1.81
47	T11140702	40	1.014	18	886	112	1.8	87.4	11.0	Explosion	1.34
48	T11140703	40	1.014	15	887	112	1.5	87.5	11.0	Non-Explosion	<1.02
49	T11140704	40	1.015	20	899	96	2.0	88.6	9.5	Non-Explosion	1.05
50	T11140705	40	1.014	20	898	96	2.0	88.6	9.5	Non-Explosion	1.05
51	T11140706	40	1.014	23	890	101	2.3	87.8	10.0	Non-Explosion	1.05
52	T11140707	40	1.015	23	885	106	2.3	87.3	10.4	Explosion	1.19
53	T11140708	40	1.014	25	884	105	2.5	87.2	10.4	Explosion	1.09
54	T11140709	40	1.014	26	883	105	2.6	87.1	10.4	Non-Explosion	1.05
55	T11140710	40	1.014	26	883	105	2.6	87.1	10.4	Non-Explosion	1.06
56	T11140711	40	1.014	26	883	105	2.6	87.1	10.4	Non-Explosion	1.07
57	T11140712	40	1.014	20	889	105	2.0	87.7	10.4	Explosion	1.21
58	T11140713	40	1.014	17	892	105	1.7	88.0	10.4	Non-Explosion	1.04
59	T11140714	40	1.014	18	891	105	1.8	87.9	10.4	Explosion	1.21
60	T11140715	40	1.014	17	892	105	1.7	88.0	10.4	Non-Explosion	1.03
61	T11140716	40	1.014	17	892	105	1.7	88.0	10.4	Non-Explosion	1.03
62	T11140717	40	1.014	21	890	103	2.1	87.8	10.2	Explosion	1.1
63	T11140718	40	1.014	21	891	102	2.1	87.9	10.1	Explosion	1.09
64	T11140719	40	1.014	21	892	101	2.1	88.0	10.0	Explosion	1.08
65	T11140720	40	1.014	22	891	101	2.2	87.9	10.0	Explosion	1.1
66	T11140721	40	1.014	23	890	101	2.3	87.8	10.0	Non-Explosion	1.05
67	T11140722	40	1.014	23	890	101	2.3	87.8	10.0	Non-Explosion	1.08
68	T11140723	40	1.014	19	894	101	1.9	88.2	10.0	Explosion	1.12
69	T11140724	40	1.014	19	895	101	1.9	88.3	10.0	Non-Explosion	1.06
70	T11140725	40	1.014	18	893	101	1.8	88.0	10.0	Non-Explosion	1.09
71	T11140726	40	1.014	18	895	101	1.8	88.3	10.0	Non-Explosion	1.04
72	T11140727	40	1.014	20	895	89	2.0	88.3	8.8	Non-Explosion	1.08
73	T11140728	40	1.014	20	895	89	2.0	88.3	8.8	Explosion	1.1
74	T11140729	40	1.014	20	896	88	2.0	88.4	8.7	Non-Explosion	1.05
75	T11140730	40	1.014	20	896	88	2.0	88.4	8.7	Non-Explosion	1.08
76	T11140731	40	1.014	20	896	88	2.0	88.4	8.7	Non-Explosion	1.07
77	T11140732	40	1.014	61	761	172	6.0	75.0	17.0	Non-Explosion	1.04
78	T11140733	40	1.014	81	750	182	8.0	74.0	18.0	Explosion	1.3
79	T11140734	40	1.014	81	764	179	8.0	74.9	17.7	Explosion	1.24
80	T11140735	40	1.014	81	767	176	8.0	74.7	17.4	Non-Explosion	1.03
81	T11140736	40	1.014	81	765	178	8.0	74.5	17.6	Non-Explosion	1.05
82	T11140737	40	1.014	81	765	178	8.0	74.5	17.6	Non-Explosion	1.03
83	T11140738	40	1.014	81	765	178	8.0	74.5	17.6	Non-Explosion	1.03

Fig. 81

Série de testes 2

Teste	Nome Arquivo	Temp °C	Pressão Inicial bara	Pressões Parciais H_2O mbar	Pressões Parciais C_3H_8 mbar	Pressões Parciais N_2 mbar	Pressões Parciais O_2 mbar	Concentrações H_2O vol. %	Concentrações C_3H_8 vol. %	Concentrações N_2 vol. %	Concentrações O_2 vol. %	Resultado Não-Explosão / Explosão	Pex bara
1	T111SC700	40	1,014	41	119	641	213	4,0	11,7	63,2	21,0	Explosion	1,03
2	T111SC701	40	1,014	40	121	640	213	3,9	11,9	63,1	21,0	Non-explosion	1,07
3	T111SC702	40	1,014	41	120	640	213	4,0	11,8	63,1	21,0	Explosion	1,05
4	T111SC703	40	1,014	40	121	640	213	3,9	11,9	63,1	21,0	Non-explosion	1,06
5	T111SC704	40	1,014	40	120	641	213	3,9	11,8	63,2	21,0	Explosion	1,05
6	T111SC705	40	1,014	40	121	640	213	3,9	11,9	63,1	21,0	Non-explosion	1,06
7	T111SC706	40	1,014	40	15	746	213	3,9	1,5	73,6	21,0	Explosion	4,80
8	T111SC707	40	1,014	41	15	745	213	4,0	1,5	73,5	21,0	Explosion	5,27
9	T111SC708	40	1,014	41	14	746	213	4,0	1,4	73,6	21,0	Non-explosion	1,05
10	T111SC709	40	1,014	42	14	745	213	4,1	1,4	73,5	21,0	Non-explosion	1,03
11	T111SC710	40	1,014	41	14	746	213	4,0	1,4	73,6	21,0	Non-explosion	1,03
12	T111SC701	40	1,014	41	20	859	103	4,0	2,0	83,6	10,2	Explosion	1,11
13	T111SC702	40	1,014	41	20	851	102	4,0	2,0	83,9	10,1	Explosion	1,11
14	T111SC703	40	1,014	41	20	852	101	4,0	2,0	84,0	10,0	Explosion	1,09
15	T111SC704	40	1,014	41	20	853	100	4,0	2,0	84,1	9,9	Explosion	1,09
16	T111SC705	40	1,014	41	20	854	99	4,0	2,0	84,2	9,8	Non-explosion	1,07
17	T111SC706	40	1,014	40	20	855	99	3,9	2,0	84,3	9,8	Non-explosion	1,06
18	T111SC707	40	1,014	41	20	854	99	4,0	2,0	84,2	9,8	Non-explosion	1,08

Fig. 82

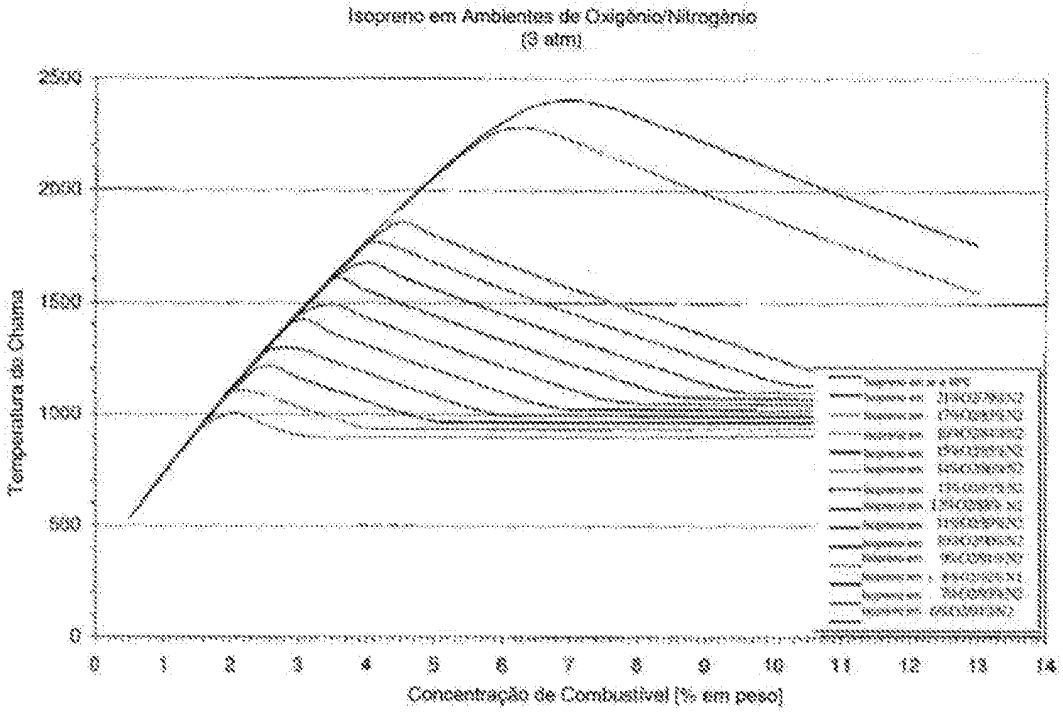

Isopreno em Ambientes de Oxigênio/Nitrogênio
(3 atm)
Temperatura da Chama
2500
2000
1500
1000
500
0
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
Concentração de Combustível [% em peso]

Fig. 83

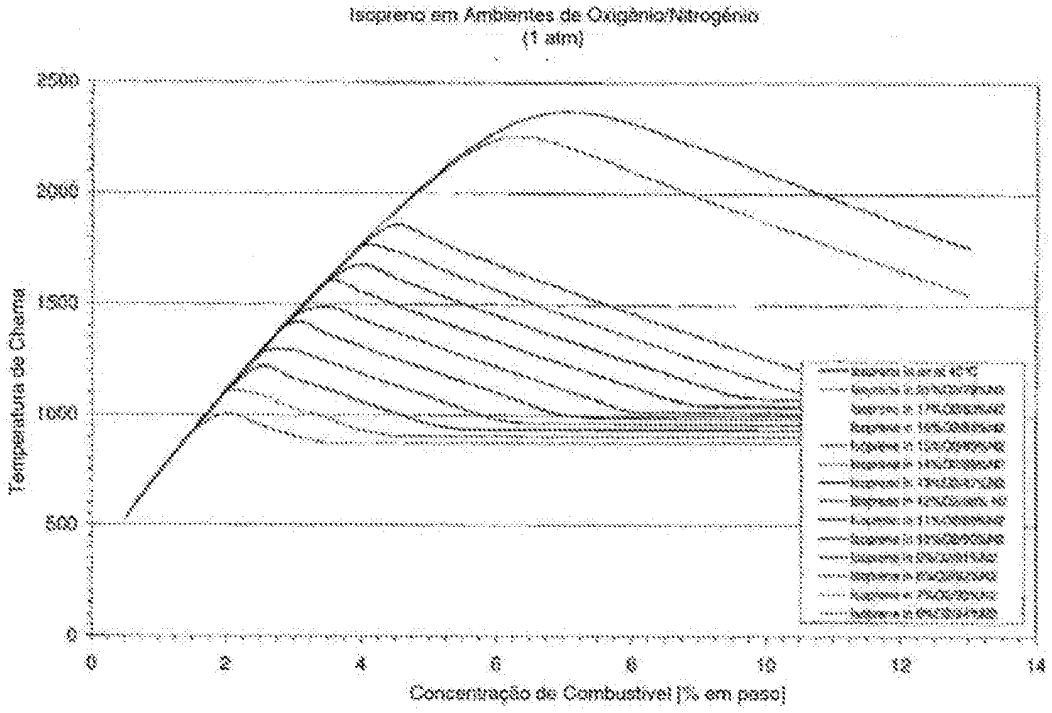

Isopreno em Ambientes de Oxigênio/Nitrogênio
(1 atm)
Temperatura de Chama
2500
2000
1500
1000
500
0
0
2
4
6
8
10
12
14
Concentração de Combustível [% em peso]

Fig. 84

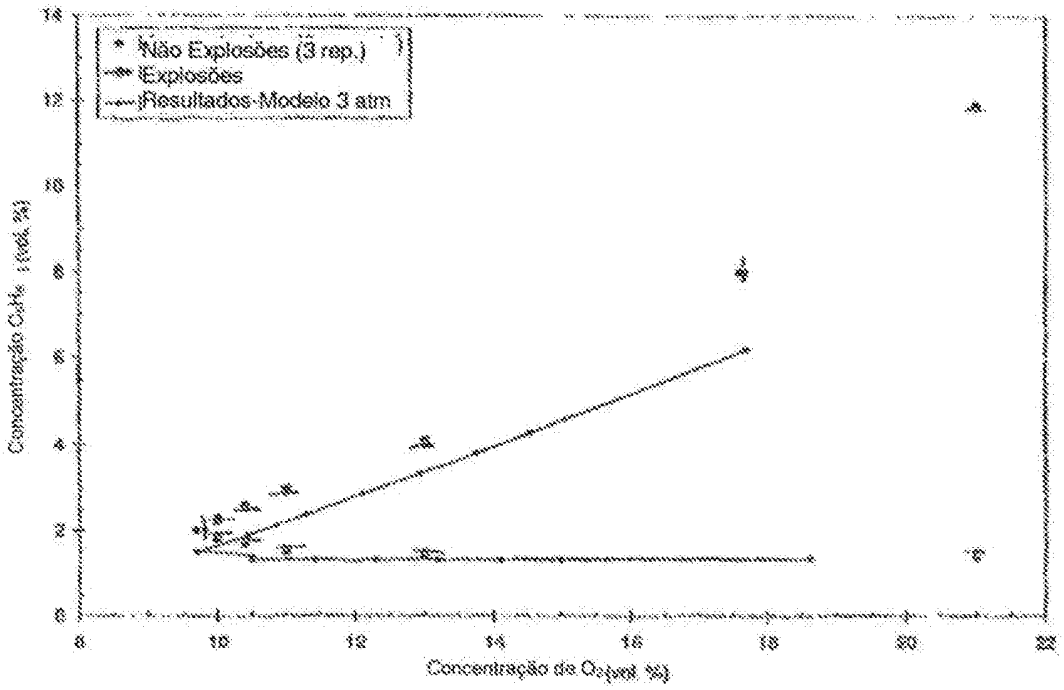

Não Explosões (3 rep.)
Explosões
Resultados-Modelo 3 atm
Concentração de O2 (vol. %)

Fig. 85

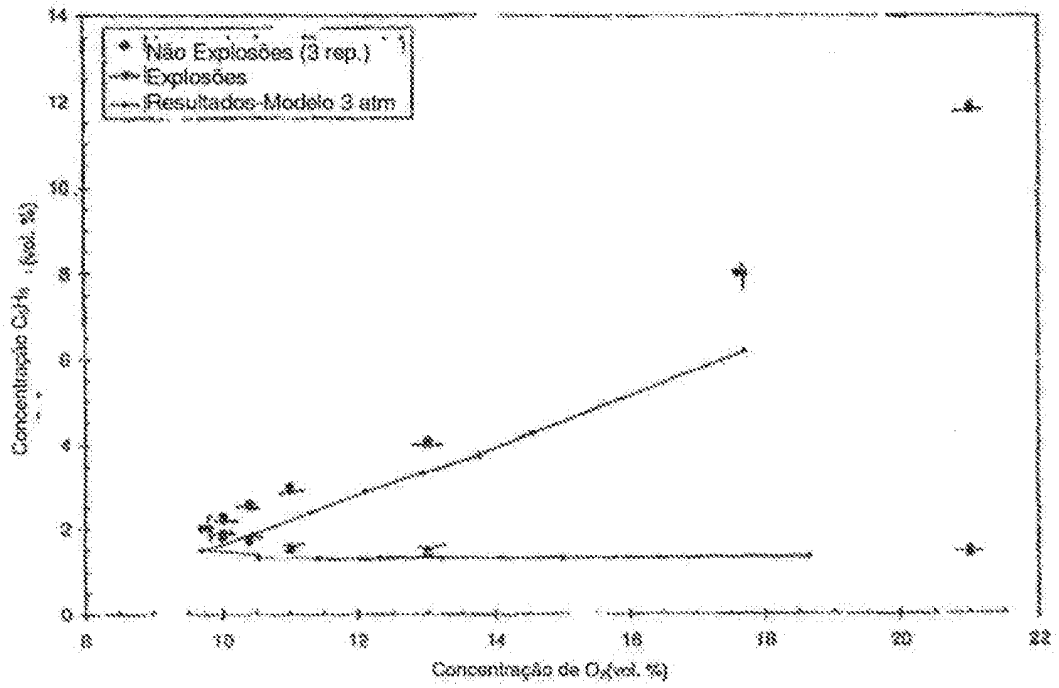

Não Explosões (3 rep.)
Explosões
Resultados-Modelo 3 atm
Concentração de O2(vol. %)
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22

Fig. 68

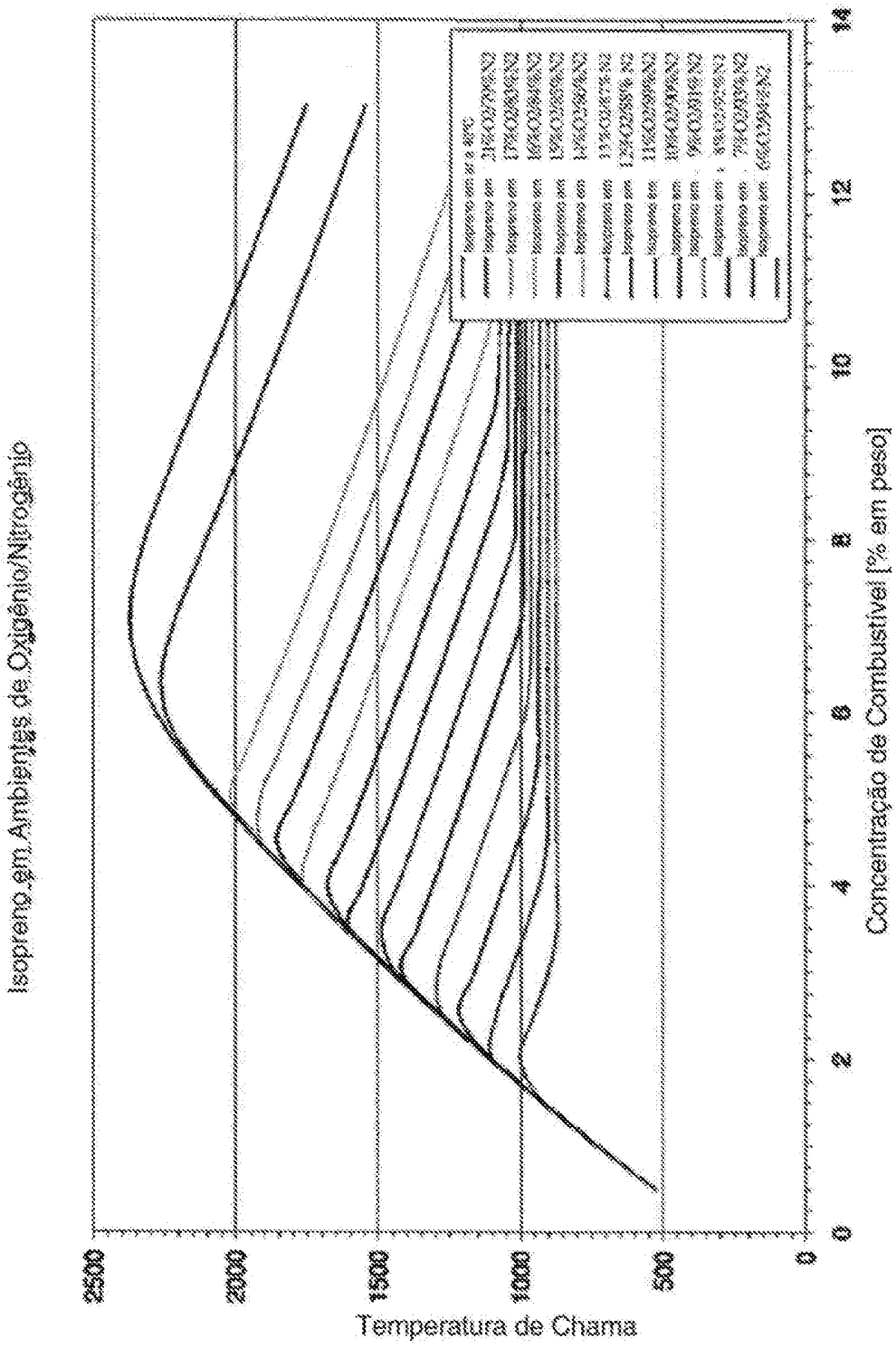

Isopreno em Ambientes de Oxigênio/Nitrogênio
Temperatura de Chama
2500
2000
1500
1000
500
0
0
2
4
6
8
10
12
14
Concentração de Combustível [% em peso]

Fig. 69

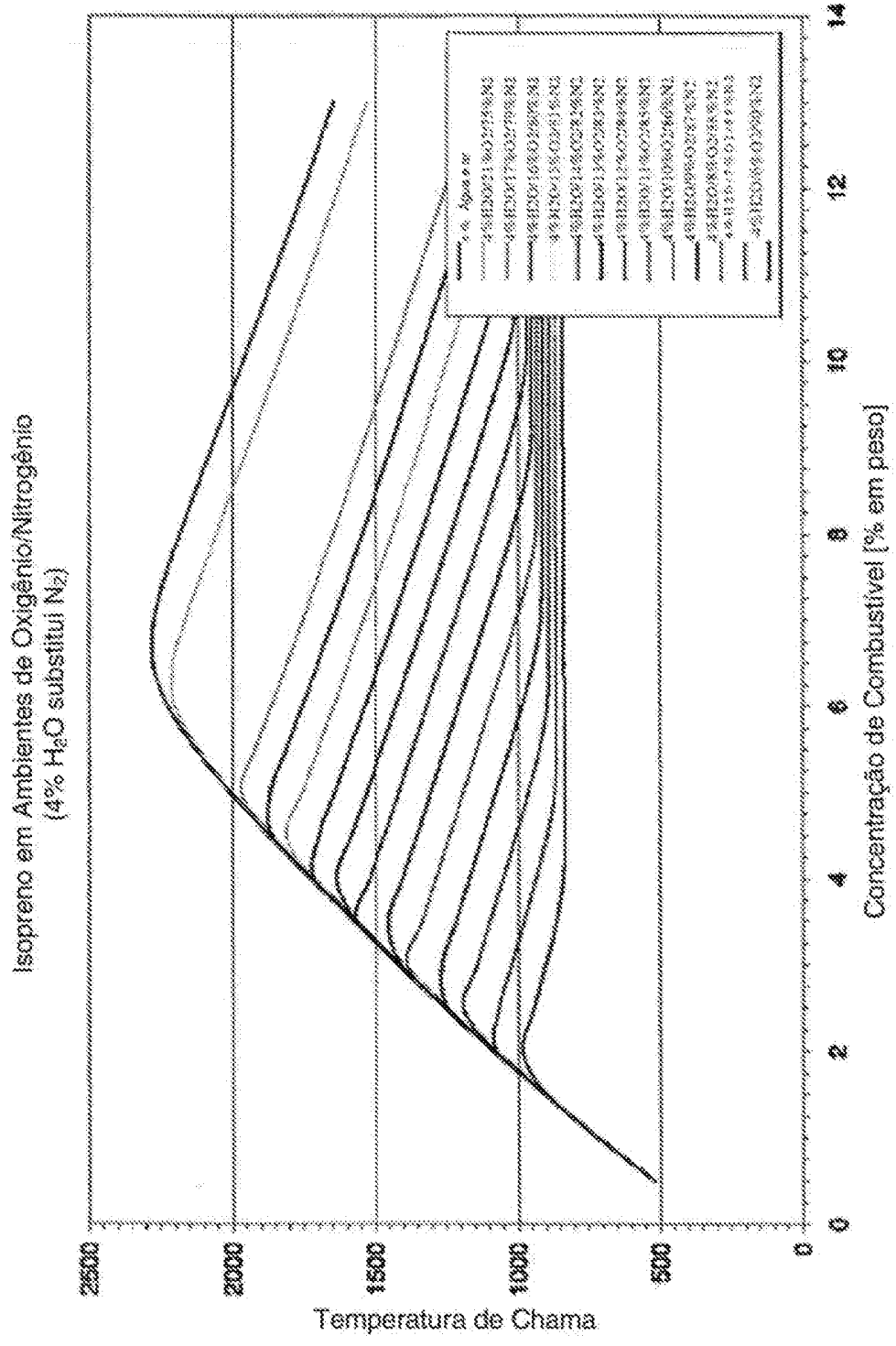

Isopreno em Ambientes de Oxigênio/Nitrogênio
(4% H_2O substitui N_2)
Temperatura de Chama
2500
2000
1500
1000
500
0
0
2
4
6
8
10
12
14
Concentração de Combustível [% em peso]

Fig. 70

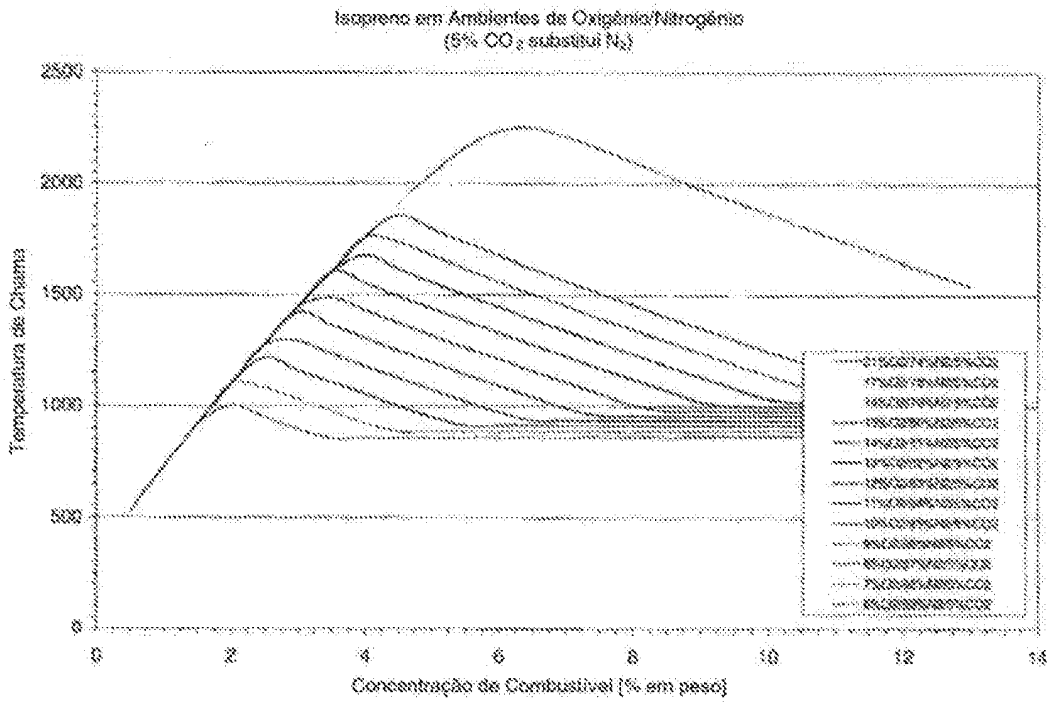

Isopreno em Ambientes de Oxigênio/Nitrogênio
(5% CO_2 substitui N_2)
Temperatura de Chama
2500
2000
1500
1000
500
0
0
2
4
6
8
10
12
14
Concentração de Combustível (% em peso)

Fig. 71

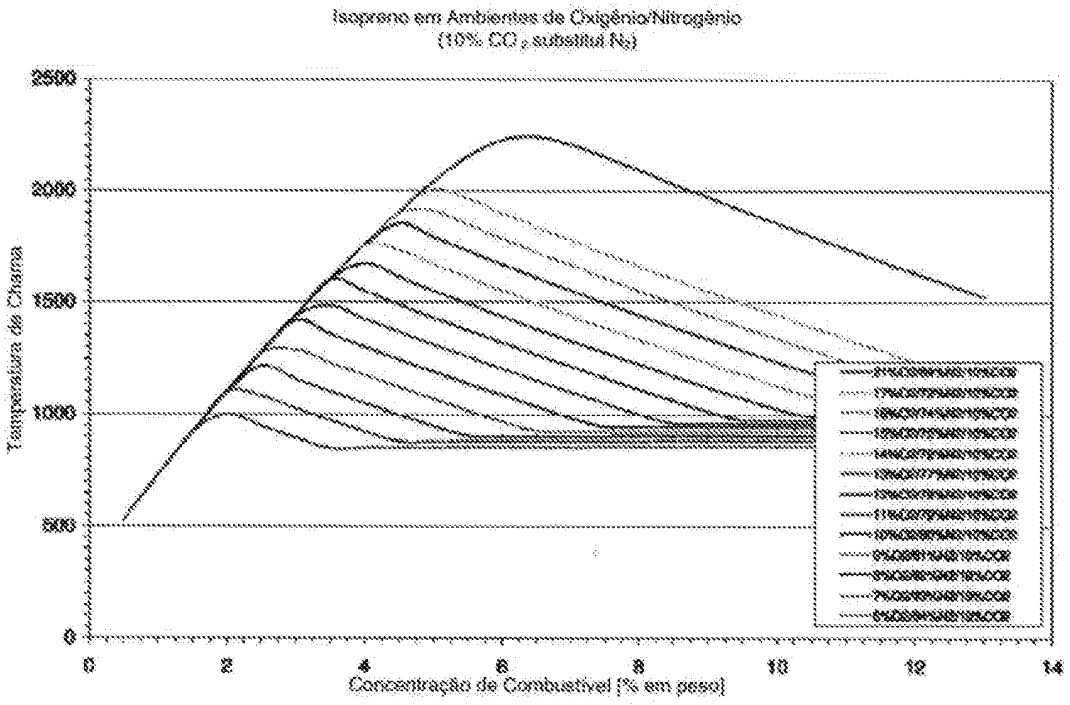

Isoprene em Ambientes de Oxigênio/Nitrogênio
(10% CO , substitui N2)
Temperatura de Chama
2500
2000
1500
1000
500
0
0
2
4
6
8
10
12
14
Concentração de Combustível [% em peso]

Fig. 72

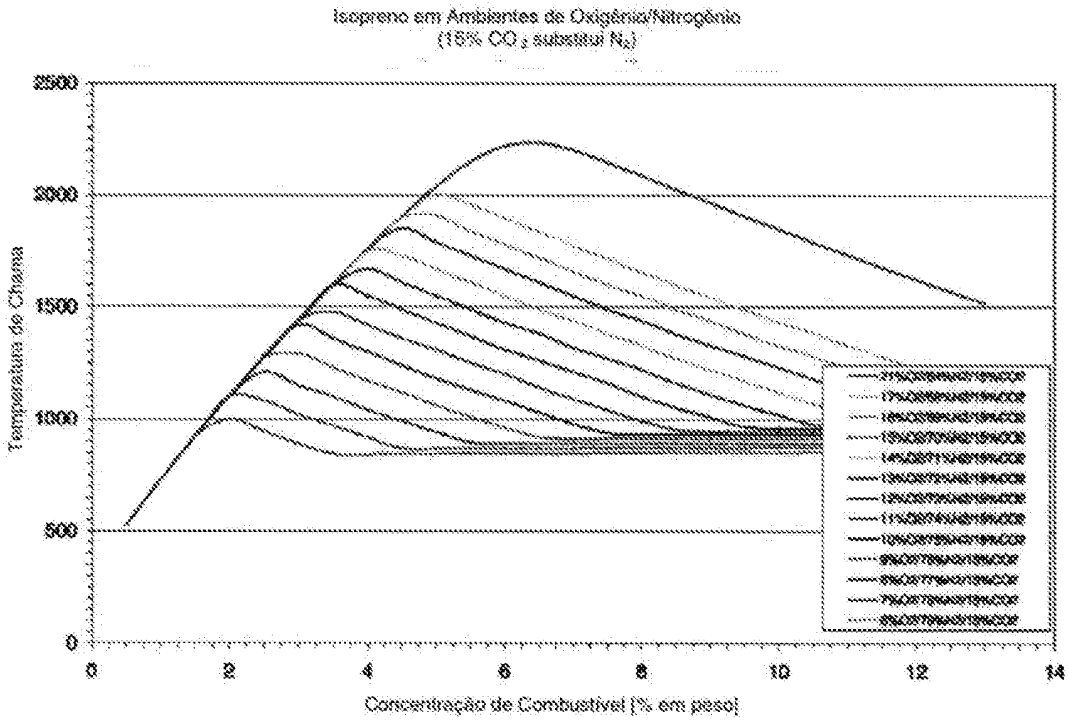

Isopreno em Ambientes de Oxigênio/Nitrogênio
(15% CO_2 substitui N_2)
Temperatura de Chama
2500
2000
1500
1000
500
0
0
2
4
6
8
10
12
14
Concentração de Combustível [% em peso]

Fig. 73

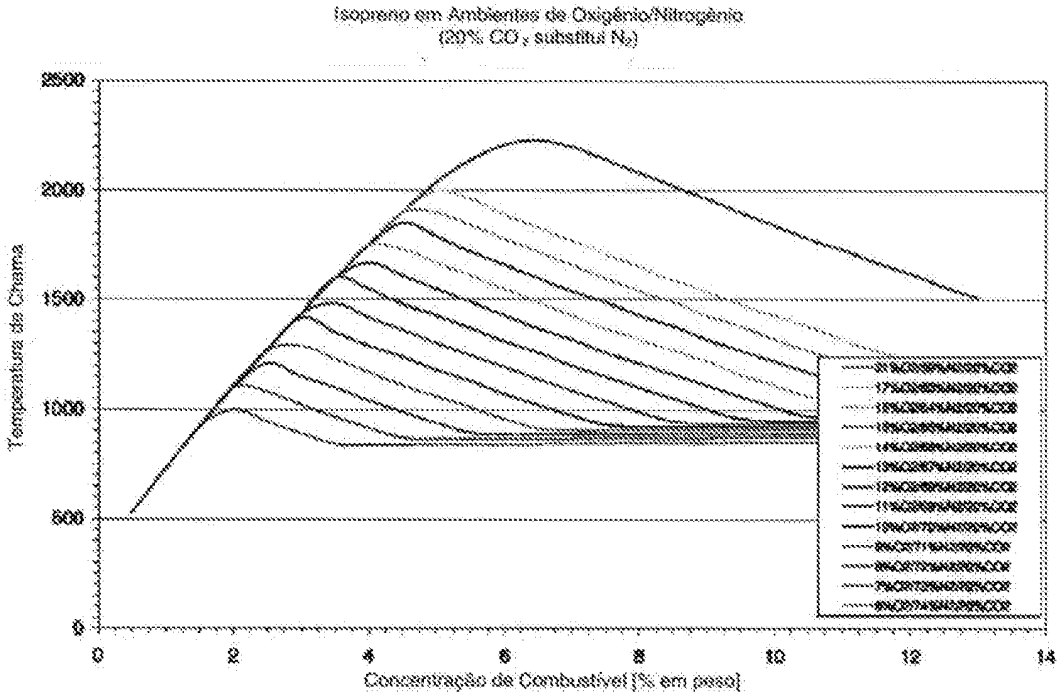

Isopreno em Ambientes de Oxigênio/Nitrogênio
(20% CO_2 substitui N_2)
Temperatura de Chama
2500
2000
1500
1000
500
0
0
2
4
6
8
10
12
14
Concentração de Combustível [% em peso]

Fig. 74

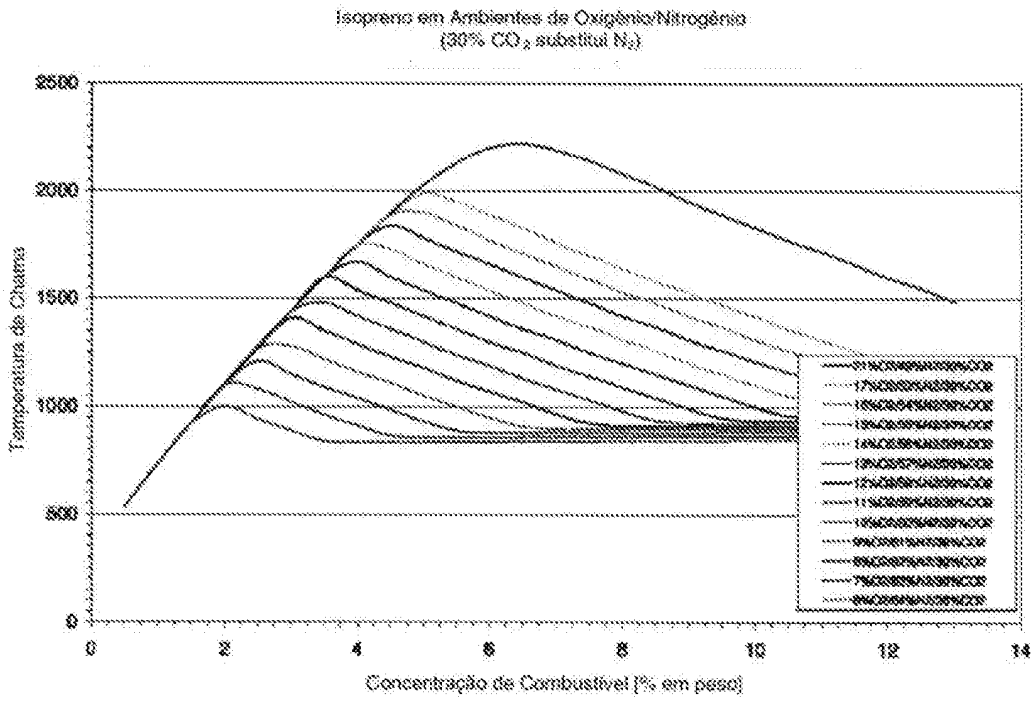

Isopreno em Ambientes de Oxigênio/Nitrogênio
(30% CO_2 substitui N_2)
Temperatura de Chama
2500
2000
1500
1000
500
0
0
2
4
6
8
10
12
14
Concentração de Combustível [% em peso]

Fig. 75A

Concentração na Deflagração																				
		Constituição Combustível		Constituição Oxidante			Concentração Molar baseada em 100g de amostra							Concentração Volumétrica baseada na lei dos gases ideais						
Concentração Combustível	Concentração Oxidante	Isopreno	H_2O	O_2	N_2	Isopreno	H_2O	O_2	N_2	Total	Isopreno	O_2	N_2	H_2O						
(%vol)	(%vol)	(%vol)	(%vol)	(%vol)	(%vol)	(mol%)	(mol%)	(mol%)	(mol%)	(mol%)	(%vol)	(%vol)	(%vol)	(%vol)						
3.10	96.90	100	0	12	88	4.56	0.00	36.34	304.54	345.44	1.32	10.52	88.16	0.00						
3.10	96.90	100	0	13	87	4.56	0.00	39.37	301.08	345.01	1.32	11.41	87.27	0.00						
3.10	96.90	100	0	14	86	4.56	0.00	42.39	297.62	344.57	1.32	12.30	86.37	0.00						
3.10	96.90	100	0	15	85	4.56	0.00	45.42	294.16	344.14	1.32	13.20	85.48	0.00						
3.10	96.90	100	0	16	84	4.56	0.00	48.45	290.70	343.71	1.33	14.10	84.58	0.00						
3.10	96.90	100	0	17	83	4.56	0.00	51.48	287.24	343.28	1.33	15.00	83.68	0.00						
3.10	96.90	100	0	21	79	4.56	0.00	63.59	273.40	341.55	1.33	18.62	80.05	0.00						
3.50	96.50	100	0	11.1	88.9	5.15	0.00	33.47	306.39	345.01	1.49	9.70	88.81	0.00						
4.40	95.60	100	0	12	88	6.47	0.00	35.85	300.46	342.78	1.89	10.46	87.65	0.00						
5.50	94.50	100	0	13	87	8.09	0.00	38.39	293.53	340.10	2.38	11.29	86.33	0.00						
6.60	93.40	100	0	14	86	9.71	0.00	40.85	286.87	337.44	2.88	12.11	85.01	0.00						
7.60	92.40	100	0	15	85	11.18	0.00	43.31	280.52	334.99	3.34	12.93	83.73	0.00						
8.50	91.50	100	0	16	84	12.50	0.00	45.75	274.50	332.75	3.76	13.75	82.48	0.00						
9.60	90.40	100	0	17	83	14.12	0.00	48.03	267.97	330.11	4.28	14.55	81.18	0.00						
13.50	86.50	100	0	21	79	19.85	0.00	56.77	244.35	320.97	6.18	17.70	76.11	0.00						

Fig. 75B

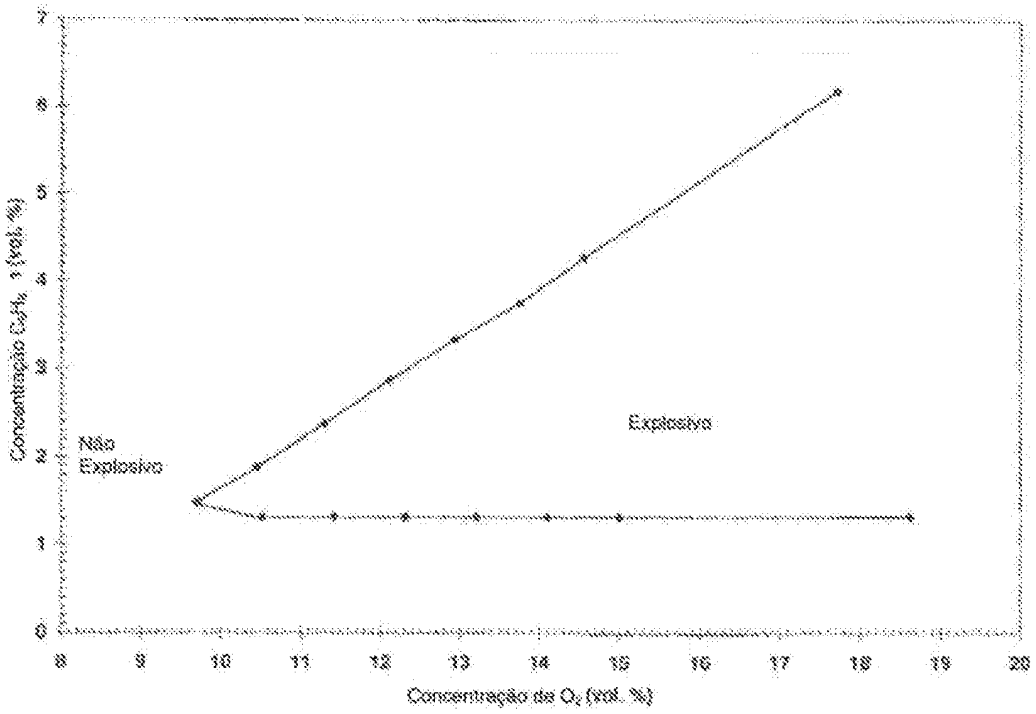


Fig. 76A

Concentração na Deflagração																				
			Constituição Combustível	Constituição Oxidante				Concentração Molar baseada em 100g de amostra						Concentração Volumétrica baseada na lei dos gases ideais						
Fuel Conc.	Oxidizer Conc.		Isopreno	H_2O	O_2	N_2		Isopreno	H_2O	O_2	N_2	Total		Isopreno	H_2O	O_2	N_2	H_2O	
(%mol)	(%mol)		(%mol)	(%mol)	(%mol)	(%mol)		(mols)	(mols)	(mols)	(mols)	(mols)		(%vol)	(%vol)	(%vol)	(%vol)	(%vol)	
3.852	96.748		100	4	12	84		4.78	21.50	38.28	290.24	352.81		1.36	10.28	82.27	6.06		
3.274	96.726		100	4	13	83		4.61	21.49	39.28	286.72	352.33		1.37	11.15	81.38	6.10		
3.290	96.710		100	4	14	82		3.84	21.49	42.31	283.22	351.86		1.38	12.02	80.49	6.11		
3.288	96.712		100	4	15	81		4.84	21.49	45.33	278.77	351.43		1.36	12.90	79.61	6.13		
3.286	96.714		100	4	16	80		4.83	21.49	48.36	276.83	351.01		1.35	13.78	78.72	6.12		
3.284	96.716		100	4	17	79		4.83	21.49	51.38	272.89	350.58		1.35	14.66	77.84	6.13		
3.276	96.724		100	4	21	75		4.82	21.49	63.48	259.05	348.87		1.35	18.19	74.26	6.16		
3.500	96.500		100	4	11.5	84.5		5.15	21.44	34.69	281.22	352.48		1.46	9.84	82.62	6.08		
4.200	95.800		100	4	12	84		6.18	21.29	35.53	287.40	350.79		1.76	10.24	81.92	6.07		
5.300	94.700		100	4	13	83		7.79	21.04	36.47	280.72	348.02		2.24	11.05	80.65	6.05		
6.400	93.600		100	4	14	82		9.41	20.80	40.95	274.11	345.28		2.73	11.86	79.39	6.02		
7.400	92.600		100	4	15	81		10.88	20.58	43.41	267.88	342.74		3.16	12.66	78.16	6.00		
8.500	91.500		100	4	16	80		12.50	20.33	45.75	261.43	340.01		3.66	13.48	76.88	5.98		
9.400	90.600		100	4	17	79		13.82	20.13	48.13	255.62	337.71		4.08	14.25	75.69	5.98		
13.300	86.700		100	4	21	75		19.56	18.27	56.90	222.23	327.95		5.96	17.25	70.61	5.87		

Fig. 76B

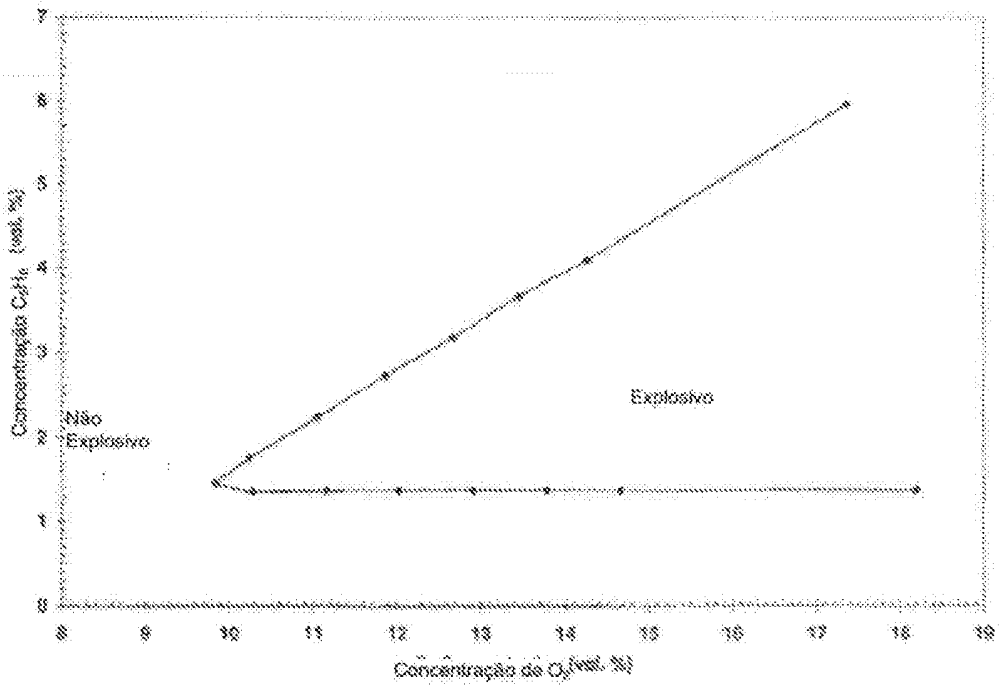
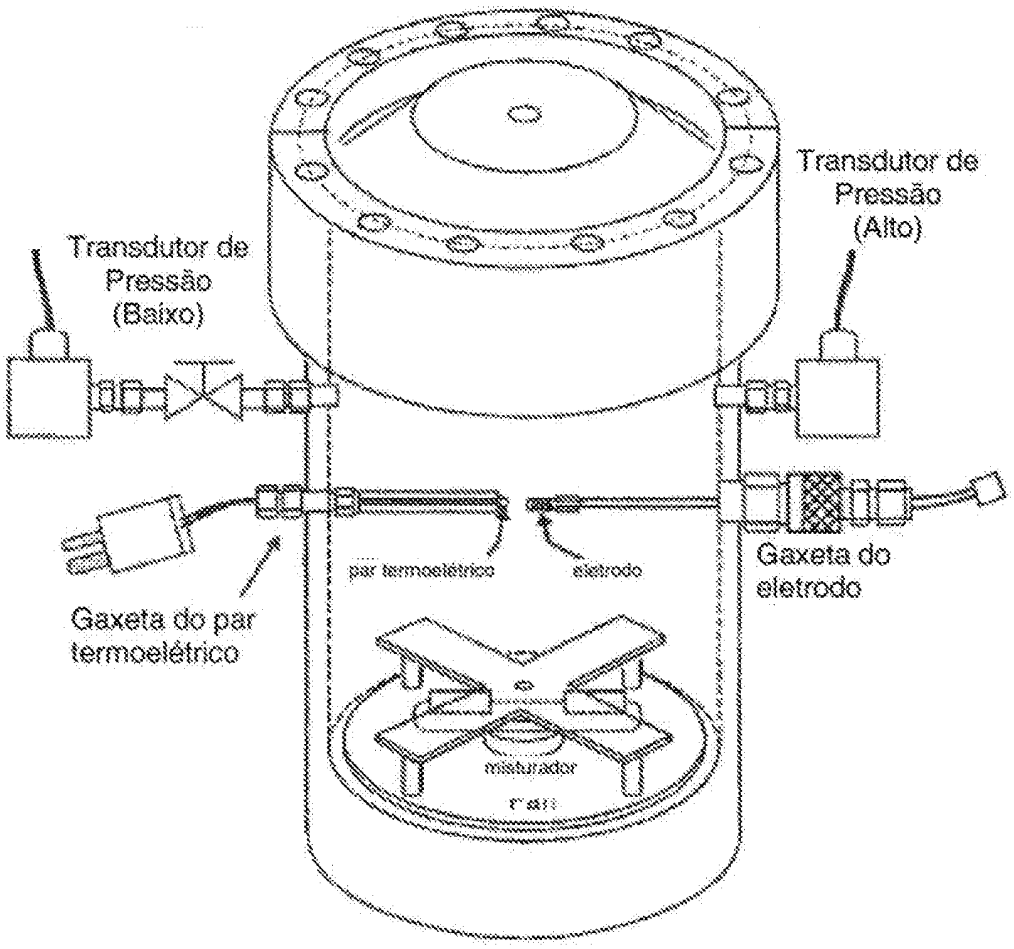


Fig. 77


Transdutor de Pressão (Alto)
Transdutor de Pressão (Baixo)
par termoelétrico
eletrodo
Gaxeta do eletrodo
Gaxeta do par termoelétrico
misturador

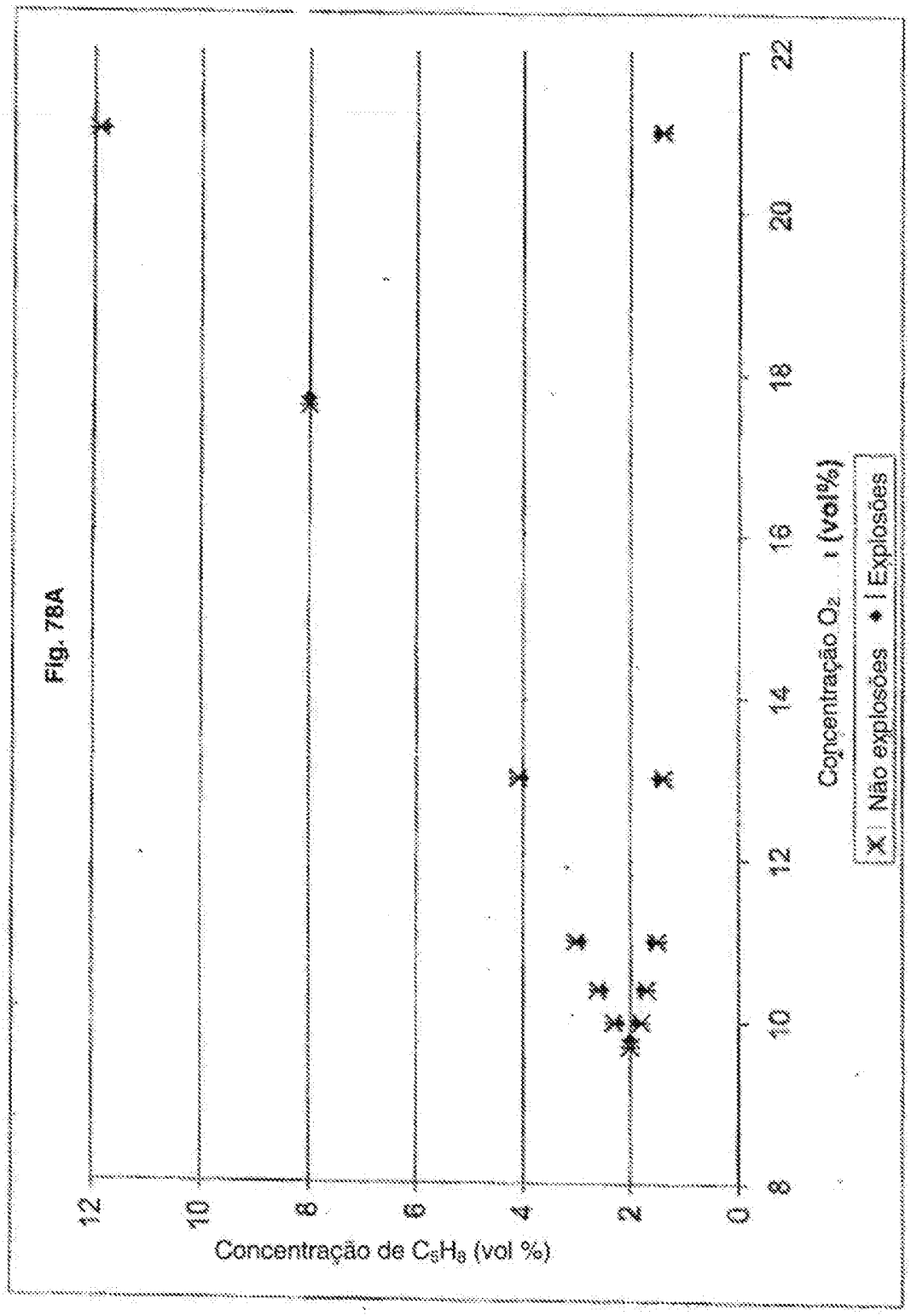
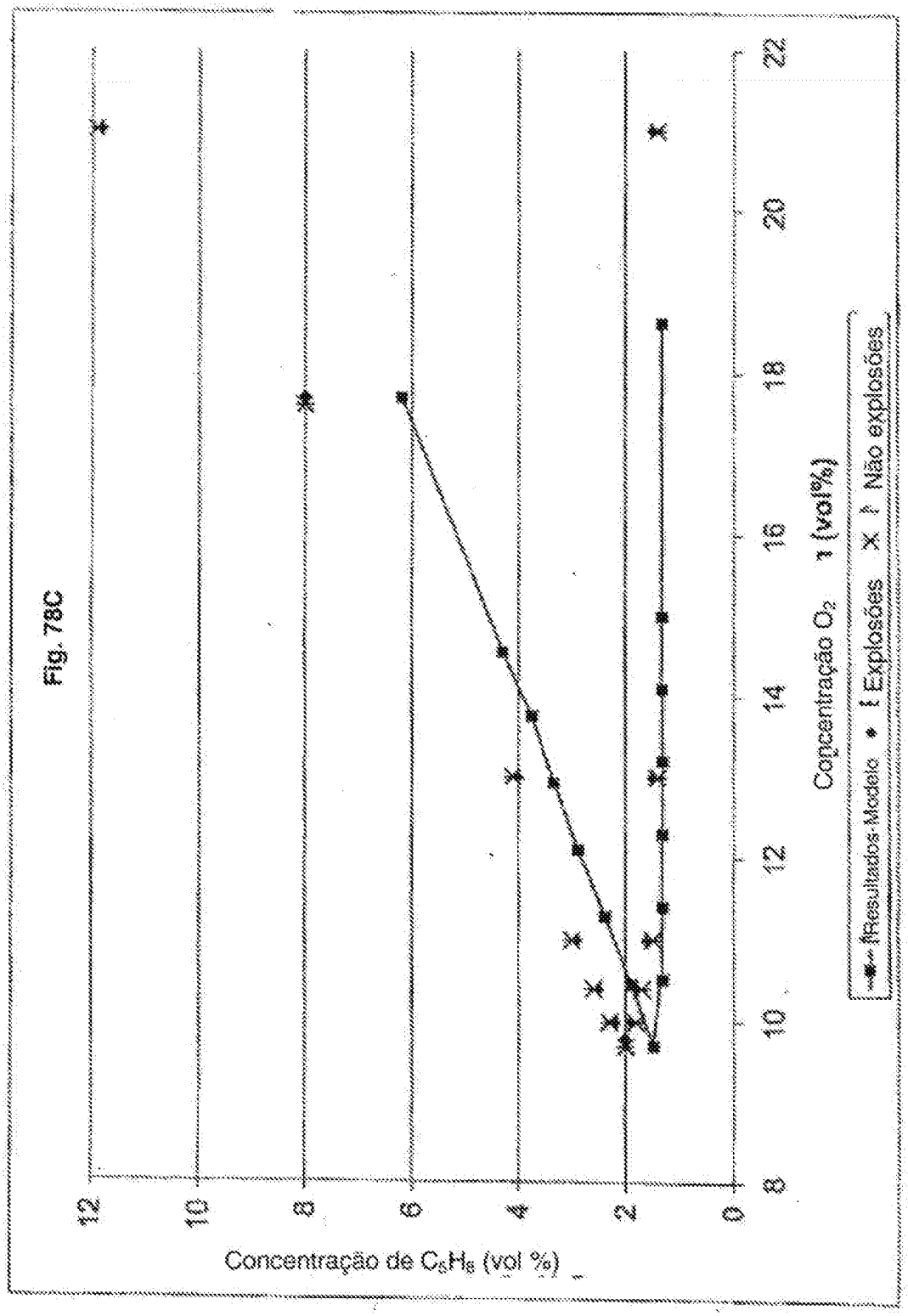

Fig. 78A
Concentração de C_5H_8 (vol %)
12
10
8
6
4
2
0
8
10
12
14
16
18
20
22
Concentração O_2 (vol%)
X Não explosões
Explosões

Fig. 78B

Explosões		Não Explosões	
Concentração de O_2	Concentração de C_3H_8	Concentração de O_2	Concentração de C_3H_8
(vol. %)	(vol. %)	(vol. %)	(vol. %)
21.0	1.5	21.0	1.4
13.0	1.5	13.0	1.4
11.0	1.6	11.0	1.5
10.4	1.8	10.4	1.7
10.0	1.9	10.0	1.8
9.8	2	9.7	2
10.0	2.2	10.0	2.3
10.4	2.5	10.4	2.6
11.0	2.9	11.0	3.0
13.0	4.0	13.0	4.1
17.7	8.0	17.6	8.0
21.0	11.8	21.0	11.9


Fig. 78C
Concentração de C_6H_6 (vol %)
0
2
4
6
8
10
12
Concentração O_2 (vol%)
8
10
12
14
16
18
20
22
Resultados Modelo
Explosões
Não explosões

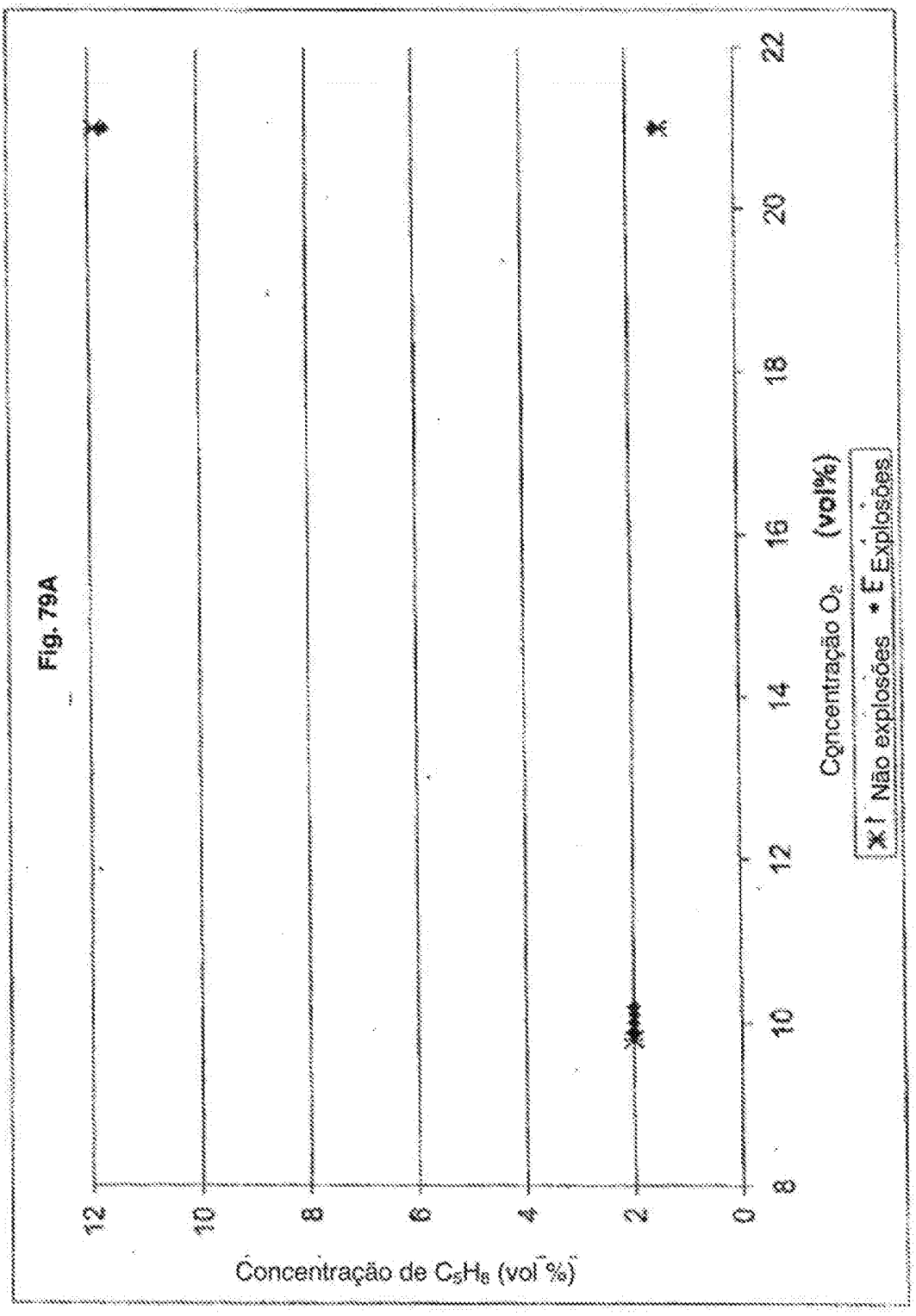

Fig. 79A
Concentração de C_3H_8 (vol %)
12
10
8
6
4
2
0
8
10
12
14
16
18
20
22
Concentração O_2 (vol%)
Não explosões
Explosões

Fig. 79B

Explosões		Não Explosões	
Concentração de O_2 (vol. %)	Concentração de C_2H_6 (vol. %)	Concentração de O_2 (vol. %)	Concentração de C_2H_6 (vol. %)
21.0	11.7	21.0	11.9
21.0	11.8	21.0	11.9
21.0	11.8	21.0	11.9
21.0	1.5	21.0	1.4
21.0	1.5	21.0	1.4
10.2	2.0	21.0	1.4
10.1	2.0	9.8	2.0
10.0	2.0	9.8	2.0
9.9	2.0	9.8	2.0

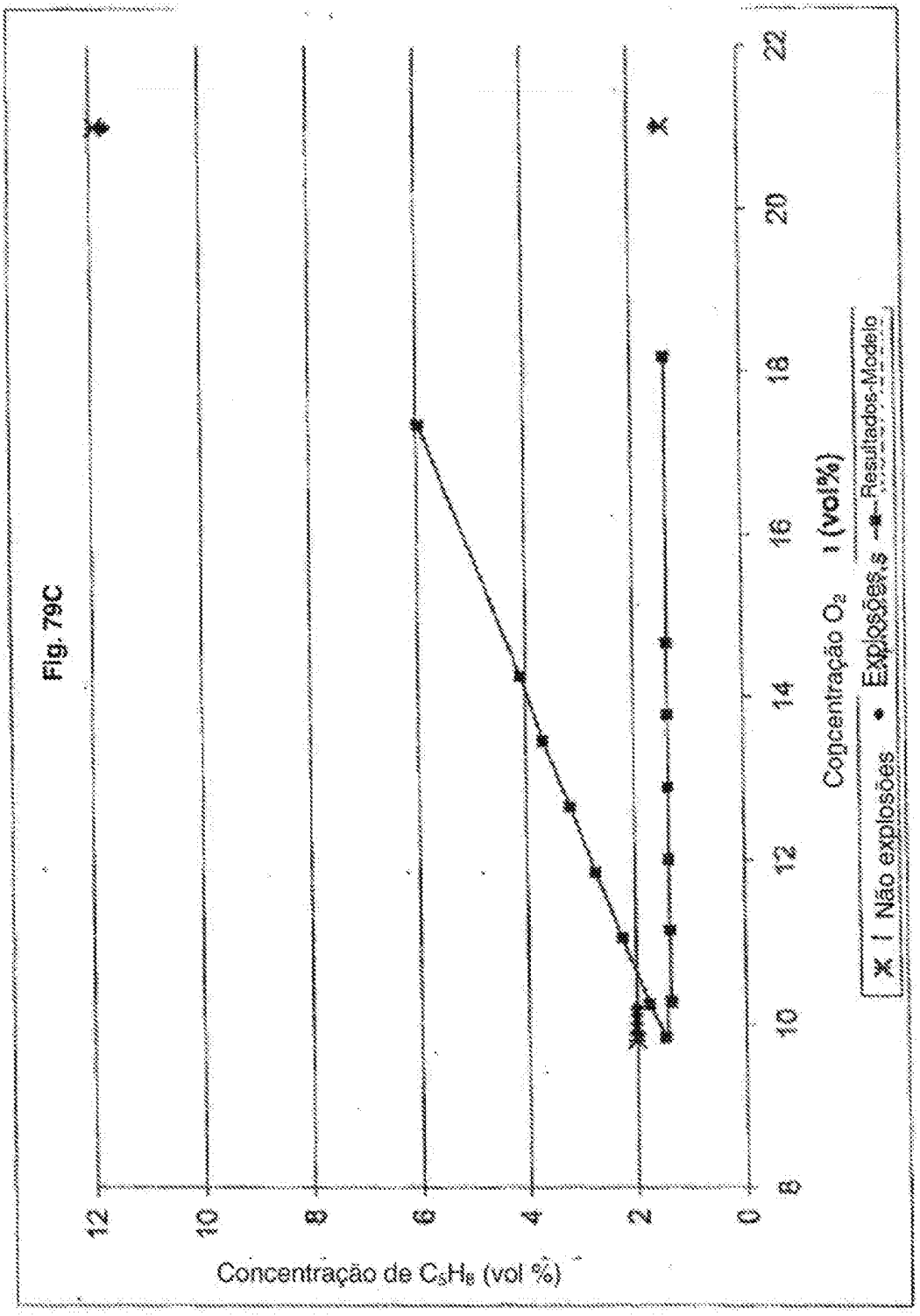

Fig. 79C
Concentração de C_3H_8 (vol %)
Concentração O_2 (vol%)
0
2
4
6
8
10
12
8
10
12
14
16
18
20
22
Não explosões
Explosões
Resultados-Modelo

Fig. 80A

Série de testes 1

Teste	Nome Arquivo	Temp °C	Pressão Inicial bara	Pressões Parciais C_2H_2 mbar	Pressões Parciais N_2 mbar	Pressões Parciais O_2 mbar	Concentrações C_2H_2 vol. %	Concentrações N_2 vol. %	Concentrações O_2 vol. %	Resultado	Pex bara
1	T11120700	40	1.012	12	787	213	1.2	77.8	21.0	Non-Explosion	1.05
2	T11120701	40	1.016	16	787	213	1.6	77.5	21.0	Explosion	5.8
3	T11120702	40	1.015	14	788	213	1.4	77.6	21.0	Non-Explosion	<1.02
4	T11120703	40	1.014	15	786	213	1.5	77.5	21.0	Non-Explosion	<1.02
5	T11120704	40	1.014	15	786	213	1.5	77.5	21.0	Explosion	4.31
6	T11120705	40	1.017	18	785	214	1.8	77.2	21.0	Explosion	5.47
7	T11120706	40	1.014	15	786	213	1.5	77.5	21.0	Explosion	4.51
8	T11120707	40	1.014	14	787	213	1.4	77.6	21.0	Non-Explosion	<1.02
9	T11120708	40	1.014	14	787	213	1.4	77.6	21.0	Non-Explosion	1.05
10	T11120709	40	1.016	102	700	213	10.0	69.0	21.0	Explosion	1.45
11	T11120710	40	1.014	102	699	213	10.1	68.9	21.0	Explosion	1.39
12	T11120711	40	1.014	106	695	213	10.5	68.5	21.0	Explosion	1.34
13	T11120712	40	1.014	113	688	213	11.1	67.9	21.0	Explosion	1.29
14	T11120713	40	1.014	122	679	213	12.0	67.0	21.0	Non-Explosion	<1.02
15	T11120714	40	1.014	117	684	213	11.5	67.5	21.0	Explosion	1.32
16	T11120715	40	1.014	120	681	213	11.8	67.2	21.0	Non-Explosion	1.08
17	T11130700	40	1.014	120	681	213	11.8	67.2	21.0	Explosion	1.03
18	T11130701	40	1.014	121	680	213	11.9	67.1	21.0	Non-Explosion	1.07
19	T11130702	40	1.015	121	681	213	11.9	67.1	21.0	Non-Explosion	1.08
20	T11130703	40	1.015	121	681	213	11.9	67.1	21.0	Non-Explosion	1.07
21	T11130704	40	1.015	30	853	132	3.0	84.0	13.0	Explosion	1.61
22	T11130705	40	1.014	36	846	132	3.6	83.4	13.0	Explosion	1.28
23	T11130706	40	1.014	39	843	132	3.8	83.1	13.0	Explosion	1.12
24	T11130707	40	1.015	41	842	132	4.0	83.0	13.0	Explosion	1.09
25	T11130708	40	1.014	42	840	132	4.1	82.8	13.0	Non-Explosion	1.06
26	T11130709	40	1.015	42	841	132	4.1	82.9	13.0	Non-Explosion	1.06
27	T11130710	40	1.014	42	840	132	4.1	82.8	13.0	Non-Explosion	1.06
28	T11130711	40	1.014	15	857	132	1.5	85.5	13.0	Non-Explosion	1.03
29	T11130712	40	1.014	16	856	132	1.6	85.4	13.0	Explosion	4.81
30	T11130713	40	1.014	16	857	132	1.5	85.5	13.0	Explosion	4
31	T11130714	40	1.014	14	858	132	1.4	85.6	13.0	Non-Explosion	1.03
32	T11130715	40	1.014	14	858	132	1.4	85.6	13.0	Non-Explosion	<1.02
33	T11130716	40	1.014	14	858	132	1.4	85.6	13.0	Non-Explosion	1.03
34	T11130717	40	1.015	20	883	112	2.0	87.0	11.0	Explosion	1.7
35	T11130718	40	1.014	28	874	112	2.8	86.2	11.0	Non-Explosion	1.08
36	T11130719	40	1.014	28	874	112	2.8	86.2	11.0	Non-Explosion	1.08
37	T11130720	40	1.014	28	874	112	2.8	86.2	11.0	Explosion	1.13
38	T11130721	40	1.015	29	874	112	2.9	86.1	11.0	Non-Explosion	1.08
39	T11130722	40	1.014	28	873	112	2.9	86.1	11.0	Explosion	1.1

Fig. 80B

Teste	Nome Arquivo	Temp °C	Pressão inicial a bara	Pressões Parciais C_2H_4 mbar	N_2 mbar	O_2 mbar	Concentrações C_2H_4 vol. %	N_2 vol. %	O_2 vol. %	Resultado [illegible]	Per bara
40	T11130723	40	1.014	30	872	112	3.0	86.0	11.0	Non-Explosion	1.08
41	T11130724	40	1.014	30	872	112	3.0	86.0	11.0	Non-Explosion	1.05
42	T11130725	40	1.014	30	872	112	3.0	86.0	11.0	Non-Explosion	1.05
43	T11130726	40	1.014	15	887	112	1.5	87.5	11.0	Non-Explosion	<1.02
44	T11130727	40	1.014	15	887	112	1.5	87.5	11.0	Non-Explosion	<1.02
45	T11140700	40	1.014	16	886	112	1.6	87.4	11.0	Non-Explosion	<1.02
46	T11140701	40	1.014	17	885	112	1.7	87.3	11.0	Explosion	1.81
47	T11140702	40	1.014	16	886	112	1.6	87.4	11.0	Explosion	1.34
48	T11140703	40	1.014	15	887	112	1.5	87.5	11.0	Non-Explosion	<1.02
49	T11140704	40	1.015	20	899	96	2.0	88.6	9.5	Non-Explosion	1.05
50	T11140705	40	1.014	20	898	96	2.0	88.6	9.5	Non-Explosion	1.05
51	T11140706	40	1.014	23	890	101	2.3	87.8	10.0	Non-Explosion	1.05
52	T11140707	40	1.015	30	886	106	2.9	87.3	10.4	Explosion	1.18
53	T11140709	40	1.014	25	884	105	2.5	87.2	10.4	Explosion	1.09
54	T11140708	40	1.014	26	883	105	2.6	87.1	10.4	Non-Explosion	1.05
55	T11140710	40	1.014	26	883	105	2.6	87.1	10.4	Non-Explosion	1.06
56	T11140711	40	1.014	26	883	105	2.6	87.1	10.4	Non-Explosion	1.07
57	T11140712	40	1.014	31	883	105	3.0	87.7	10.4	Explosion	1.21
58	T11140713	40	1.014	17	882	105	1.7	88.0	10.4	Non-Explosion	1.04
59	T11140714	40	1.014	18	891	105	1.8	87.9	10.4	Explosion	1.21
60	T11140715	40	1.014	17	892	105	1.7	88.0	10.4	Non-Explosion	1.03
61	T11140716	40	1.014	17	892	105	1.7	88.0	10.4	Non-Explosion	1.03
62	T11140717	40	1.014	21	880	103	2.1	87.8	10.2	Explosion	1.1
63	T11140718	40	1.014	21	881	102	2.1	87.9	10.1	Explosion	1.09
64	T11140719	40	1.014	21	882	101	2.1	88.0	10.0	Explosion	1.09
65	T11140720	40	1.014	22	891	101	2.2	87.9	10.0	Explosion	1.1
66	T11140721	40	1.014	23	890	101	2.3	87.8	10.0	Non-Explosion	1.05
67	T11140722	40	1.014	23	890	101	2.3	87.8	10.0	Non-Explosion	1.05
68	T11140723	40	1.014	19	894	101	1.9	88.2	10.0	Explosion	1.12
69	T11140724	40	1.014	18	895	101	1.8	88.3	10.0	Non-Explosion	1.02
70	T11140725	40	1.014	18	895	101	1.8	88.3	10.0	Non-Explosion	1.03
71	T11140726	40	1.014	18	893	101	1.8	88.3	10.0	Non-Explosion	1.04
72	T11140727	40	1.014	20	895	99	2.0	88.3	9.8	Non-Explosion	1.05
73	T11140728	40	1.014	20	895	99	2.0	88.3	9.8	Explosion	1.1
74	T11140729	40	1.014	20	895	98	2.0	88.4	9.7	Non-Explosion	1.05
75	T11140730	40	1.014	20	895	98	2.0	88.4	9.7	Non-Explosion	1.06
76	T11140731	40	1.014	20	898	98	2.0	88.4	9.7	Non-Explosion	1.07
77	T11140732	40	1.014	81	761	172	8.0	75.0	17.0	Non-Explosion	1.04
78	T11140733	40	1.014	81	750	183	8.0	74.0	18.0	Explosion	1.3
79	T11140734	40	1.014	81	754	179	8.0	74.4	17.7	Explosion	1.24
80	T11140735	40	1.014	81	757	176	8.0	74.7	17.4	Non-Explosion	1.03
81	T11140736	40	1.014	81	755	178	8.0	74.5	17.6	Non-Explosion	1.05
82	T11140737	40	1.014	81	755	178	8.0	74.5	17.6	Non-Explosion	1.05
83	T11140738	40	1.014	81	755	178	8.0	74.5	17.6	Non-Explosion	1.03

Fig. 81

Série de testes 2

Teste	Nome Arquivo	Temp	Pressão Inicial	Pressões Parciais				Concentrações				Resultado	Pex
				H_2O	C_3H_8	N_2	O_2	H_2O	C_3H_8	N_2	O_2	Explosão / Não explosão	
		°C	bara	mbar	mbar	mbar	mbar	vol. %	vol. %	vol. %	vol. %		barg
1	T111SC700	40	1.014	41	119	641	213	4.0	11.7	63.2	21.0	Explosão	1.83
2	T111SC701	40	1.014	40	121	640	213	3.9	11.9	63.1	21.0	Non-explosion	1.07
3	T111SC702	40	1.014	41	120	640	213	4.0	11.8	63.1	21.0	Explosion	1.09
4	T111SC703	40	1.014	40	121	640	213	3.9	11.9	63.1	21.0	Non-explosion	1.08
5	T111SC704	40	1.014	40	120	641	213	3.9	11.8	63.2	21.0	Explosion	1.09
6	T111SC705	40	1.014	40	121	640	213	3.9	11.9	63.1	21.0	Non-explosion	1.08
7	T111SC706	40	1.014	40	16	746	213	3.9	1.6	73.6	21.0	Explosion	6.68
8	T111SC707	40	1.014	41	15	745	213	4.0	1.5	73.5	21.0	Explosion	9.27
9	T111SC708	40	1.014	41	14	746	213	4.0	1.4	73.6	21.0	Non-explosion	1.06
10	T111SC709	40	1.014	42	14	745	213	4.1	1.4	73.5	21.0	Non-explosion	1.02
11	T111SC710	40	1.014	41	14	746	213	4.0	1.4	73.6	21.0	Non-explosion	1.03
12	T111SC701	40	1.014	41	20	829	103	4.0	2.0	83.8	10.2	Explosion	1.11
13	T111SC702	40	1.014	41	20	830	102	4.0	2.0	83.9	10.1	Explosion	1.11
14	T111SC703	40	1.014	41	20	832	101	4.0	2.0	84.0	10.0	Explosion	1.09
15	T111SC704	40	1.014	41	20	823	100	4.0	2.0	84.1	9.9	Explosion	1.08
16	T111SC705	40	1.014	41	20	834	99	4.0	2.0	84.2	9.8	Non-explosion	1.07
17	T111SC706	40	1.014	40	20	833	99	3.9	2.0	84.3	9.8	Non-explosion	1.08
18	T111SC707	40	1.014	41	20	834	99	4.0	2.0	84.2	9.8	Non-explosion	1.08

Fig. 82

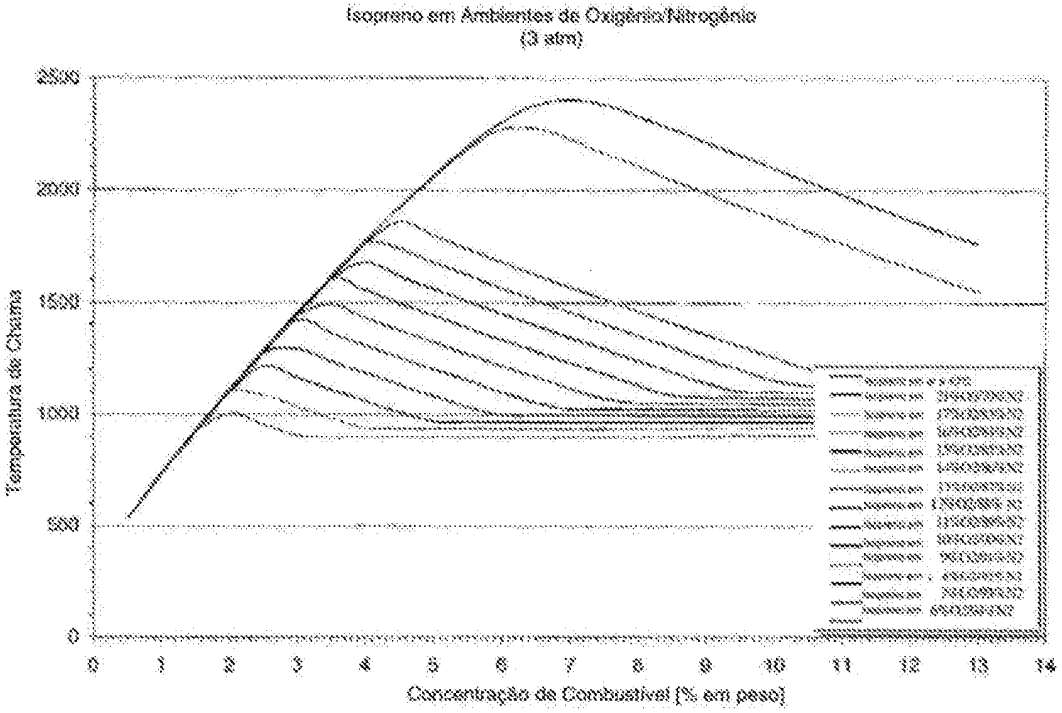

Isopreno em Ambientes de Oxigênio/Nitrogênio
(3 atm)
Temperatura de Chama
2500
2000
1500
1000
500
0
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
Concentração de Combustível [% em peso]

Fig. 83

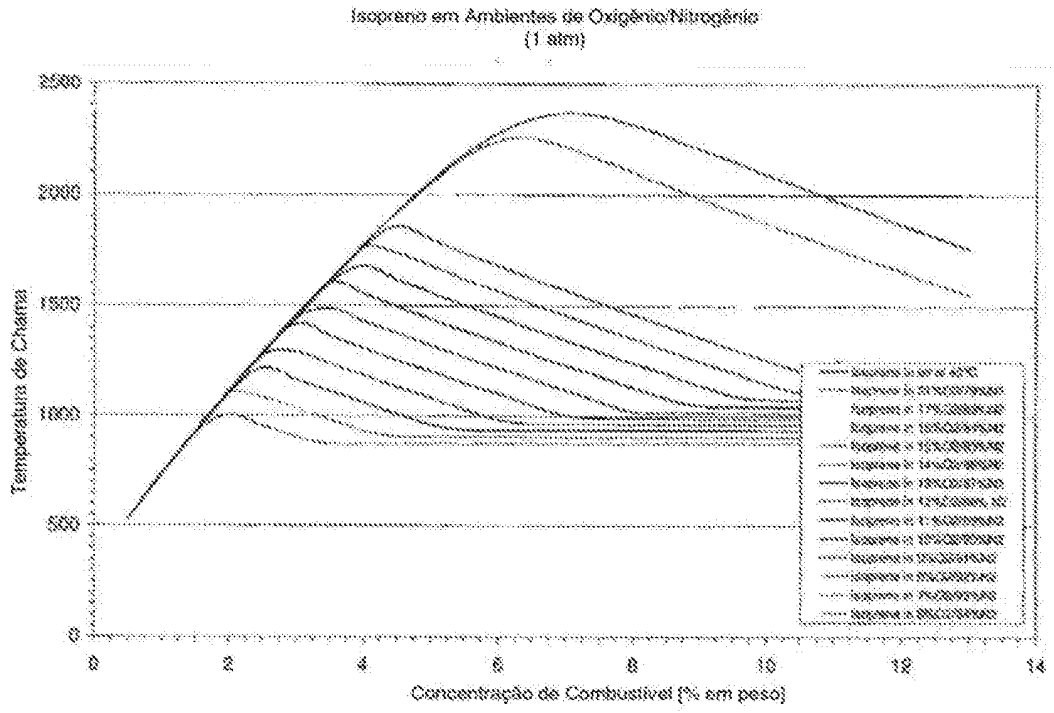

Isopreno em Ambientes de Oxigênio/Nitrogênio
(1 atm)
Temperatura de Chama
2500
2000
1500
1000
500
0
0
2
4
6
8
10
12
14
Concentração de Combustível (% em peso)

Fig. 84

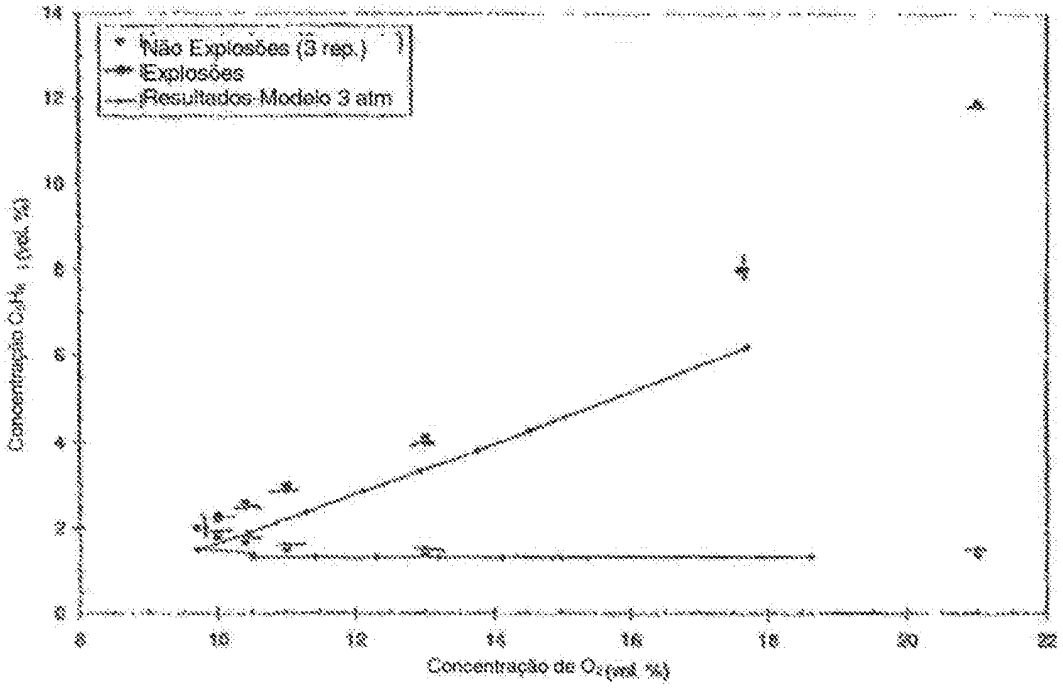

Não Explosões (3 rep.)
Explosões
Resultados Modelo 3 atm
Concentração C_3H_8 (vol. %)
Concentração de O_2 (vol. %)
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22

Fig. 85

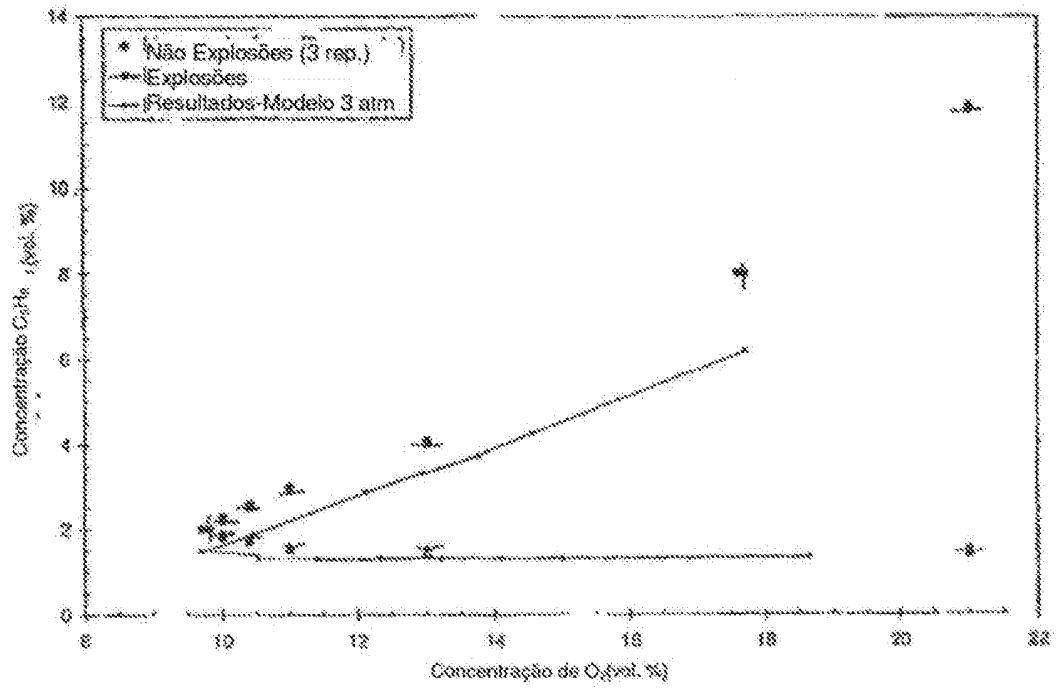

Não Explosões (3 rep.)
Explosões
Resultados-Modelo 3 atm
Concentração C_2H_4 (vol. %)
Concentração de O_2(vol. %)
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22

Fig. 86A

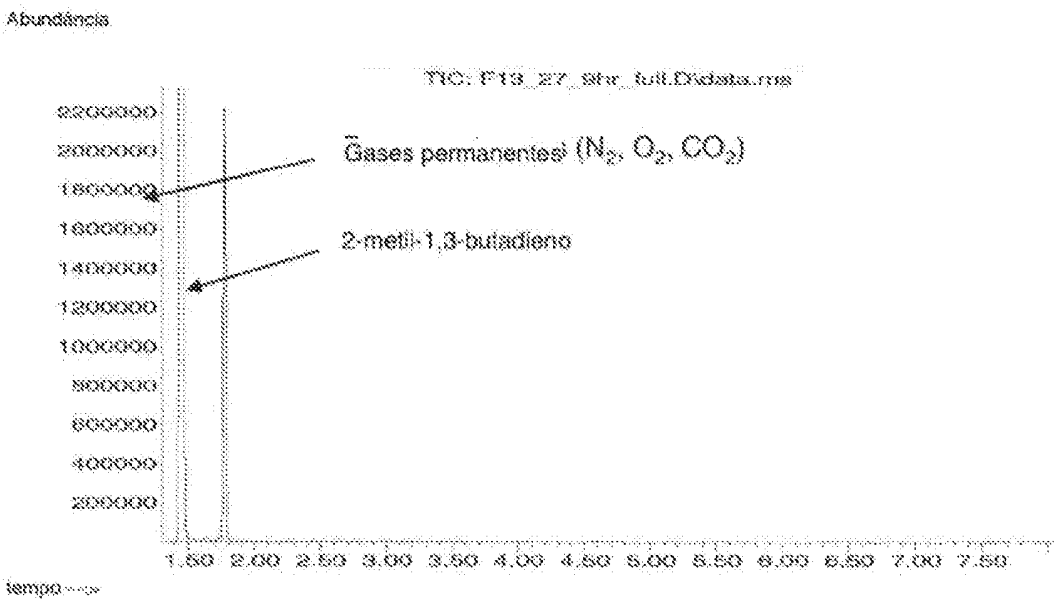

Abundância
TIC: P13_27_sht_full.Dfdata.ms
2200000
2000000
1800000
1600000
1400000
1200000
1000000
800000
600000
400000
200000
Gases permanentes (N_2, O_2, CO_2)
2-metil-1,3-butadieno
1.50 2.00 2.50 3.00 3.50 4.00 4.50 5.00 5.50 6.00 6.50 7.00 7.50
tempo

Fig. 86B

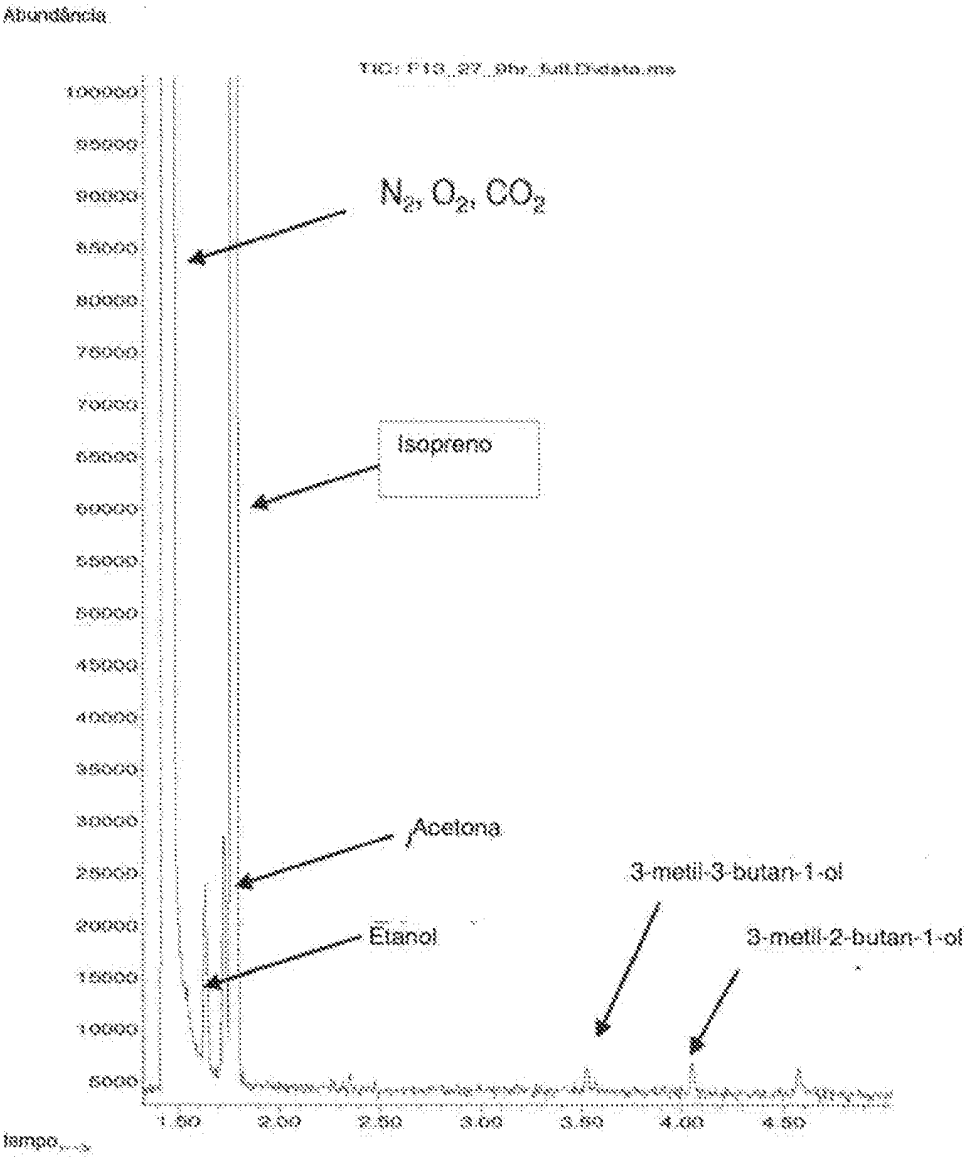

Abundância
TIC: P13_27_9hr_full.D\data.ms
100000
95000
90000
85000
80000
75000
70000
65000
60000
55000
50000
45000
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
N_2, O_2, CO_2
Isopreno
Acetona
Etanol
3-metil-3-butan-1-ol
3-metil-2-butan-1-ol
1.50
2.00
2.50
3.00
3.50
4.00
4.50
tempo

Fig. 87A

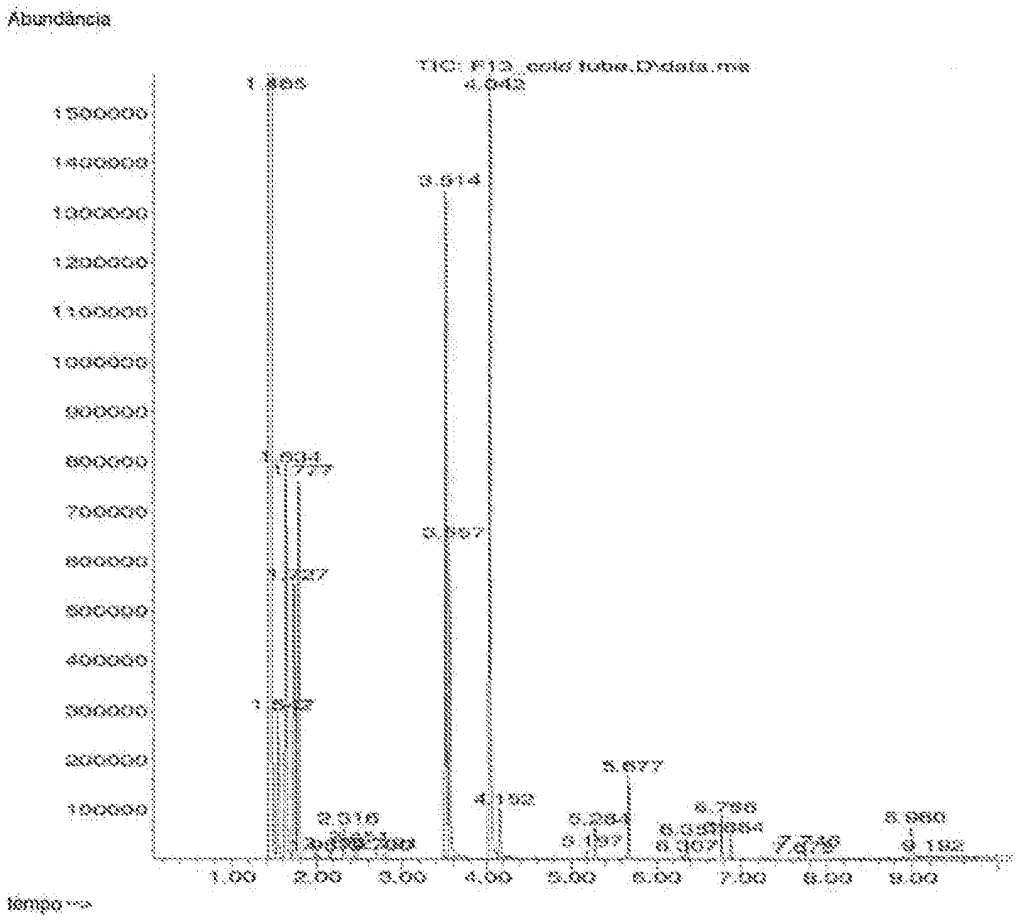

Abundância
TIC: F13_gold tube.D\data.ms
1.885
4.042
3.614
5.677
4.152
6.788
8.980
1500000
1400000
1300000
1200000
1100000
1000000
900000
800000
700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
1.00
2.00
3.00
4.00
5.00
6.00
7.00
8.00
9.00
Tempo

Fig. 87B

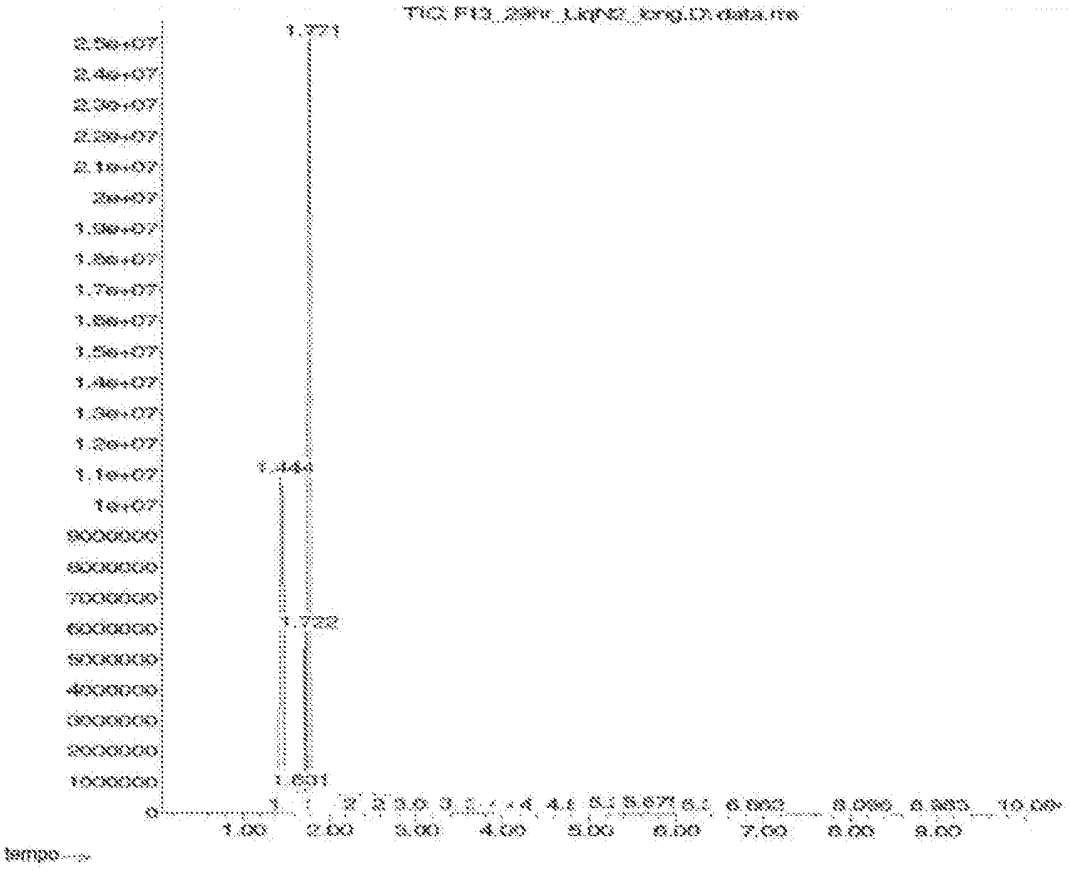

Abundância
TIC: F13_298v_Lig#2_long.D\data.ms
1.771
1.444
1.722
1.631
1.00
2.00
3.00
4.00
5.00
6.00
7.00
8.00
9.00
Tempo

Fig. 87C

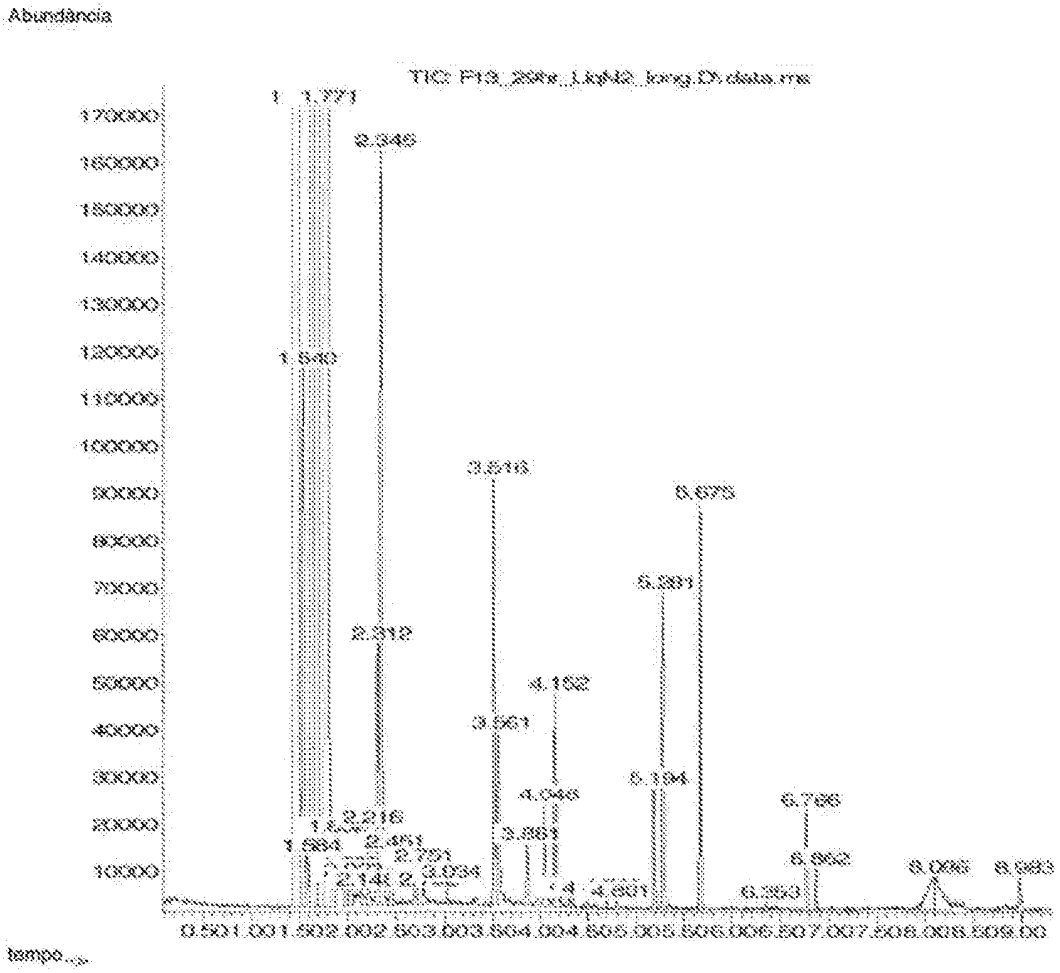

Abundância
TIC: P13_20Re_LipM2_long.D\data.ms
1.771
2.946
1.540
3.616
6.675
6.281
2.512
4.152
3.961
6.194
4.046
6.786
2.216
2.451
2.731
3.034
3.881
6.962
6.350
8.066
8.983
tempo

Fig. 87D

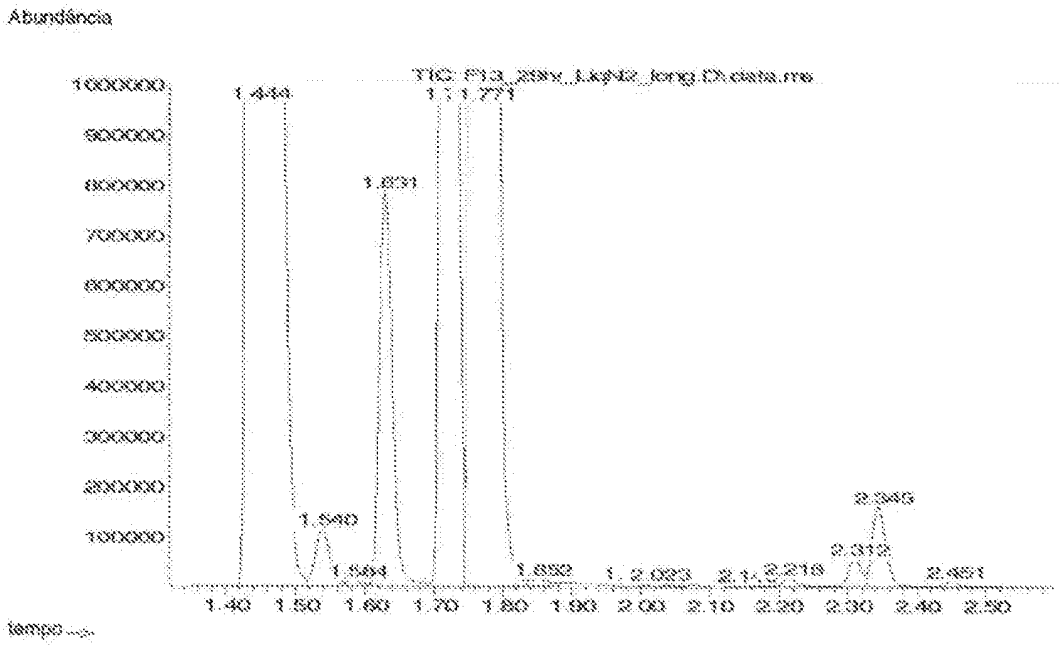
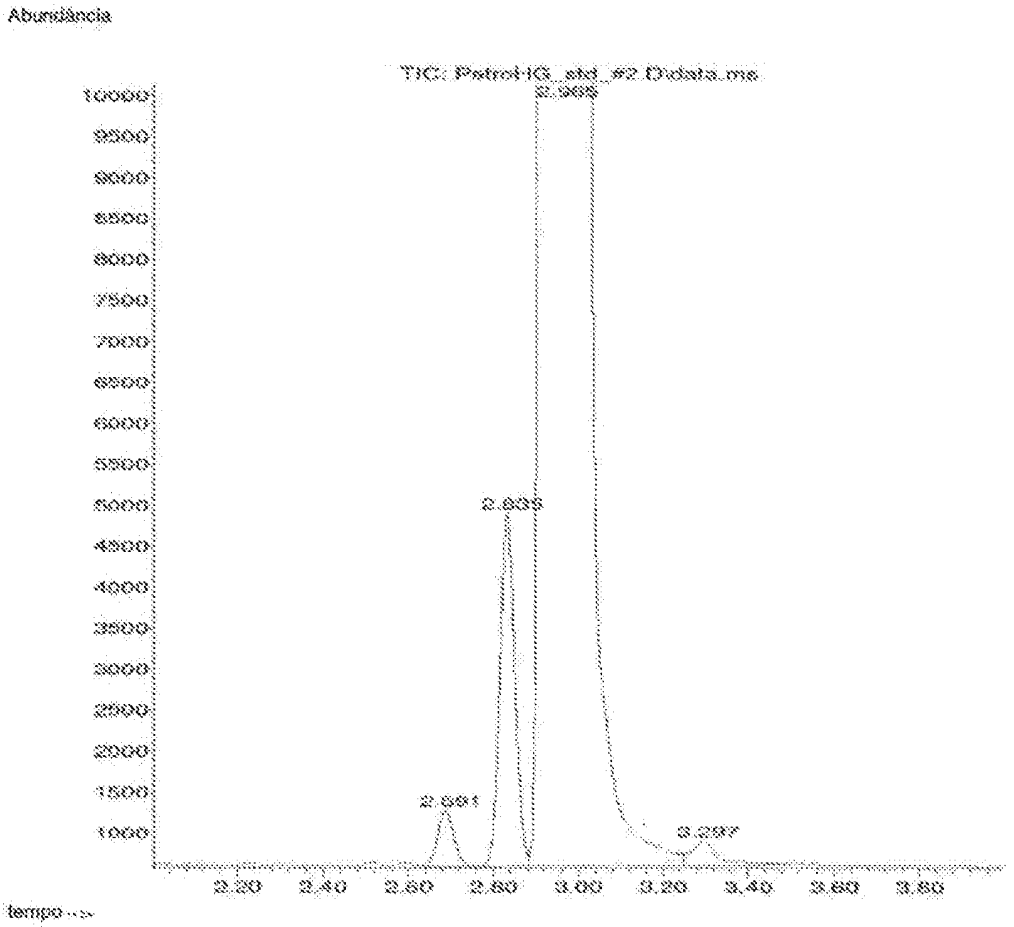
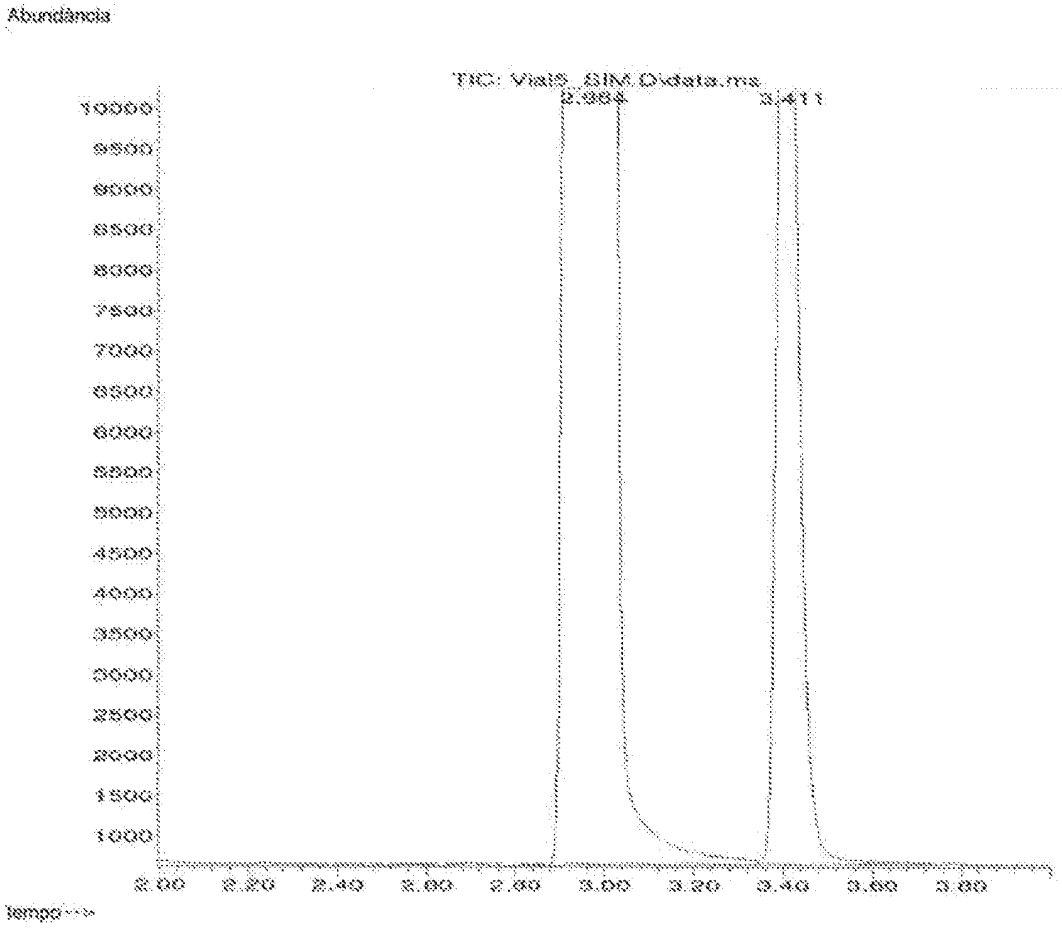

Abundância
1000000
900000
800000
700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
1.444
1.640
1.584
1.631
1.771
1.652
2.346
2.312
2.219
2.451
1.40
1.50
1.60
1.70
1.80
1.90
2.00
2.10
2.20
2.30
2.40
2.50
Tempo

Fig. 88A



2-metil-1,3-butadieno padrão

Fig. 88B



2-metil-1,3-butadieno de E. coli recombinante

Fig. 89

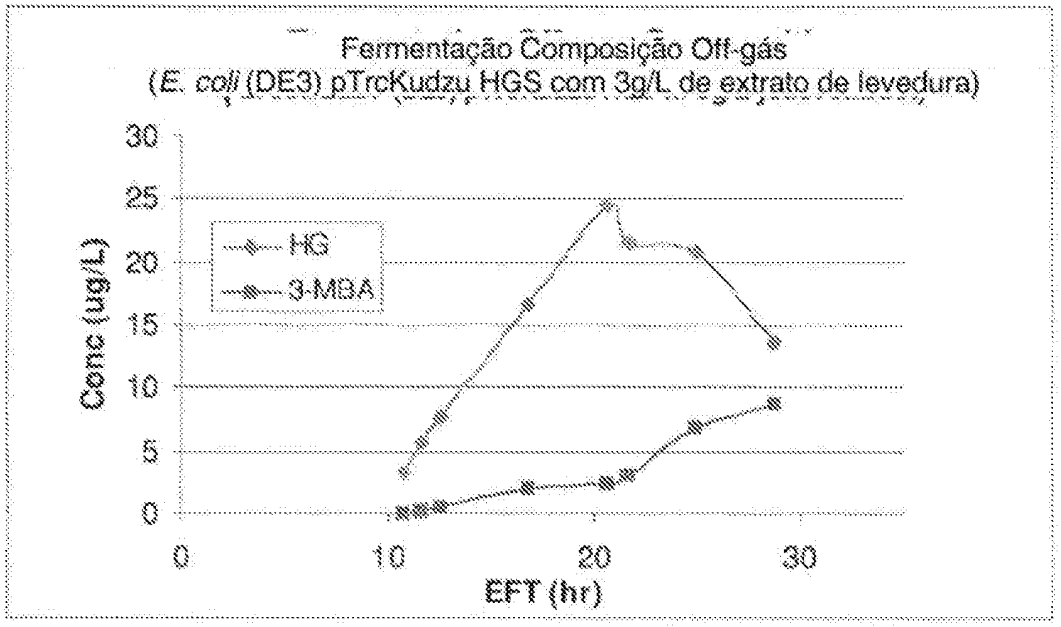
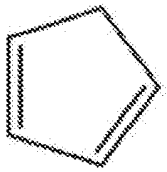
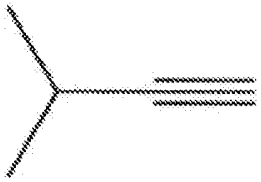

Fermentação Composição Off-gás
(E. coli (DE3) pTrcKudzu HGS com 3g/L de extrato de levedura)
Conc (ug/L)
30
25
20
15
10
5
0
HG
3-MBA
0
10
20
30
EFT (hr)

Fig. 90



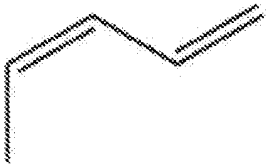
ciclopentadieno



"isoprina"=3-Me-1-butina



Trans-piperileno



Cis-piperileno



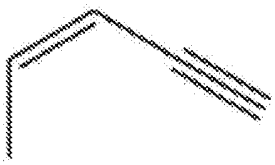
1-pentina



Pent-4-eno-1-ina



Trans-pent-3-eno-1-ina



Cis-pent-3-eno-1-ina

Fig. 91

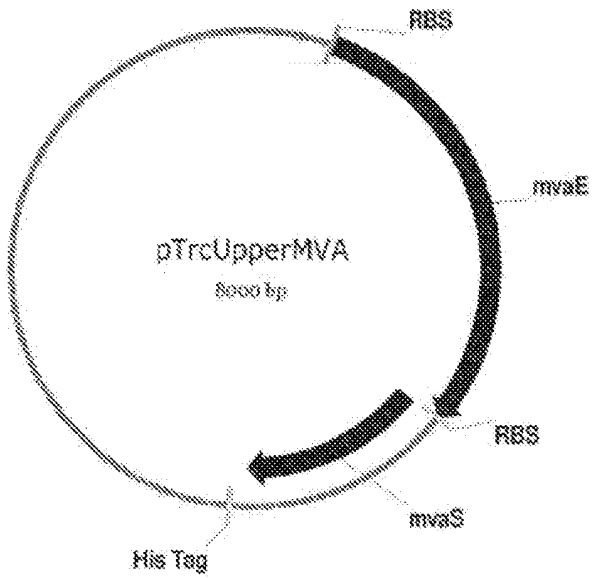


Fig. 92A

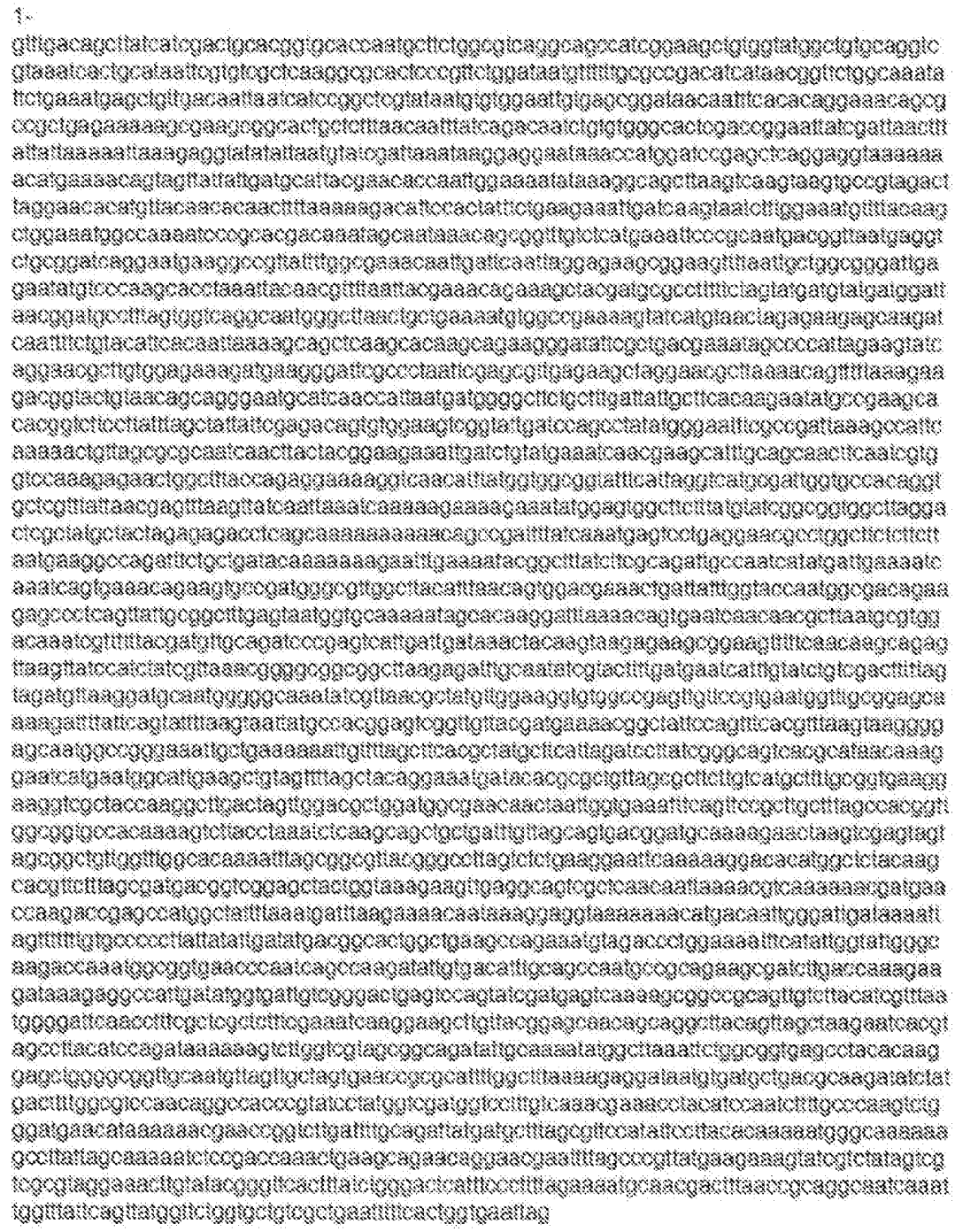


Fig. 92B

tagctggttatcaaaatcatttacaaaaagaaactcatttagcactgctggataatcggacagaacttctatcgctgaatatga
agccatgttgcagaaacttagacacagacattgatcaaacgttagaagatgaattaaaatatagtatttctgctattaataata
ccgttcgttcttatcgaaactaagagatctgcagctggtaccatatgggaattcgaagcttgggccgaacaaaaactcatct
cagaagaggatctgaatagcgccgtcgaccatcatcatcatcattgagtttaaacggtctccagcttggctgttttggcgg
atgagagaagattttcagcctgatacagattaaatcagaacgcagaagcggtctgataaaacagaatttgcctggcggcag
tagcgcggtggtcccacctgaccccatgccgaactcagaagtgaaacgccgtagcgccgatggtagtgtggggtctccc
catgcgagagtagggaactgccaggcatcaaataaaacgaaaggctcagtcgaaagactgggccttcgttttatctgttgttt
gtcggtgaacgctctcctgagtaggacaaatccgccgggagcggatttgaacgttgcgaagcaacggcccggagggtgg
cgggcaggacgcccgccataaactgccaggcatcaaattaagcagaaggccatcctgacggatggcctttttgcgtttctac
aaactcttttgtttatttttctaaatacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataatattgaa
aaaggaagagtatgagtattcaacatttccgtgtcgcccttattcccttttttgcggcattttgccttcctgtttttgctcacccagaaa
cgctggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtgggttacatcgaactggatctcaacagcggtaaga
tccttgagagttttcgccccgaagaacgttttccaatgatgagcacttttaaagttctgctatgtggcgcggtattatcccgtgttga
cgccgggcaagagcaactcggtcgccgcatacactattctcagaatgacttggttgagtactcaccagtcacagaaaagca
tcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgctgccataaccatgagtgataacactgcggccaacttacttctga
caacgatcggaggaccgaaggagctaaccgcttttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgccttgatcgttgggaacc
ggagctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaaact
attaactggcgaactacttactctagcttcccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaagttgcaggaccacttc
tgcgctcggcccttccggctggctggtttattgctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcact
ggggccagatggtaagccctcccgtatcgtagttatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagac
agatcgctgagataggtgcctcactgattaagcattggtaactgtcagaccaagtttactcatatatactttagattgatttaaaa
cttcatttttaatttaaaaggatctaggtgaagatcctttttgataatctcatgaccaaaatcccttaacgtgagttttcgttccactga
gcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatcctttttttctgcgcgtaatctgctgcttgcaaacaaaaaaa
ccaccgctaccagcggtggtttgtttgccggatcaagagctaccaactctttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgca
gataccaaatactgtccttctagtgtagccgtagttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgctctg
ctaatcctgttaccagtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttggactcaagacgatagttaccggataag
gcgcagcggtcgggctgaacggggggttcgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacctacaccgaactgagatac
ctacagcgtgagctatgagaaagcgccacgcttcccgaagggagaaaggcggacaggtatccggtaagcggcagggtc
ggaacaggagagcgcacgagggagcttccagggggaaacgcctggtatctttatagtcctgtcgggtttcgccacctctga
cttgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcaggggggcggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggcctttttacggttcctg
gccttttgctggccttttgctcacatgttctttcctgcgttatcccctgattctgtggataaccgtattaccgcctttgagtgagctgata
ccgctcgccgcagccgaacgaccgagcgcagcgagtcagtgagcgaggaagcggaagagcgcctgatgcggtatttctc
cttacgcatctgtgcggtatttcacaccgcatatggtgcactctcagtacaatctgctctgatgccgcatagttaagccagtata
cactccgctatcgctacgtgactgggtcatggctgcgccccgacacccgccaacacccgctgacgcgccctgacgggcttg
tctgctcccggcatccgcttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcagaggttttcaccgtcatcaccgaa
acgcgcgaggcagcagatcaattcgcgcgcgaaggcgaagcggcatgcatttacgttgacaccatcgaatggtgcaaaa
ccttcgcggtatggcatgatagcgcccggaagagagtcaattcagggtggtgaatgtgaaaccagtaacgttatacgatgtc
gcagagtatgccggtgtctcttatcagaccgtttcccgcgtggtgaaccaggccagccacgtttctgcgaaaacgcgggaaa
aagtggaagcggcgatggcggagctgaattacattcccaaccgcgtggcacaacaactggcgggcaaacagtcgttgct
gattggcgttgccacctccagtctggccctgcacgcgccgtcgcaaagtgtcgcggcgattaaatctcgcgccgatcaactgg
gtgccagcggtggtgtgtcgatggtagaacgaagcggcgtcgaagcctgtaaagcggcggtgcacaatcttctcgcgcaa
cgcgtcagtgggctgatcattaactatccgctggatgaccaggatgccattgctgtggaagctgcctgcactaatgttccggcg
ttatttcttgatgtctctgaccagacacccatcaacagtattatttttctcccatgaagacggtacgcgactgggcgtggagcatct
ggtcgcattgggtcaccagcaaatcgcgctgttagcgggcccattaagttctgtctcggcgcgtctgcgtctggctggctggca
taaatatctcactcgcaatcaaattcagccgatagcggaacgggaaggcgactggagtgccatgtccggtttcaacaaac
catgcaaatgctgaatgagggcatcg

Fig. 92C

ttcccactgcgatgctggttgccaacgatcagatggcgctgggcgcaatgcgcgccattaccgagtccgggctgcgcgttg
gtgcggatatctcggtagtgggatacgacgataccgaagacagctcatgttatatcccgccgtcaaccaccatcaaaacag
gattttcgcctgctggggcaaaccagcgtggaccgcttgctgcaactctctcagggccaggcggtgaagggcaatcagct
gttgcccgtctcactggtgaaaagaaaaaccaccctggcgcccaatacgcaaaccgcctctccccgcgcgttggccgatt
cattaatgcagctggcacgacaggtttcccgactggaaagcgggcagtgagcgcaacgcaattaatgtgagttagcgcg
aattgatctg

(SEQ ID NO:86)

Fig. 93

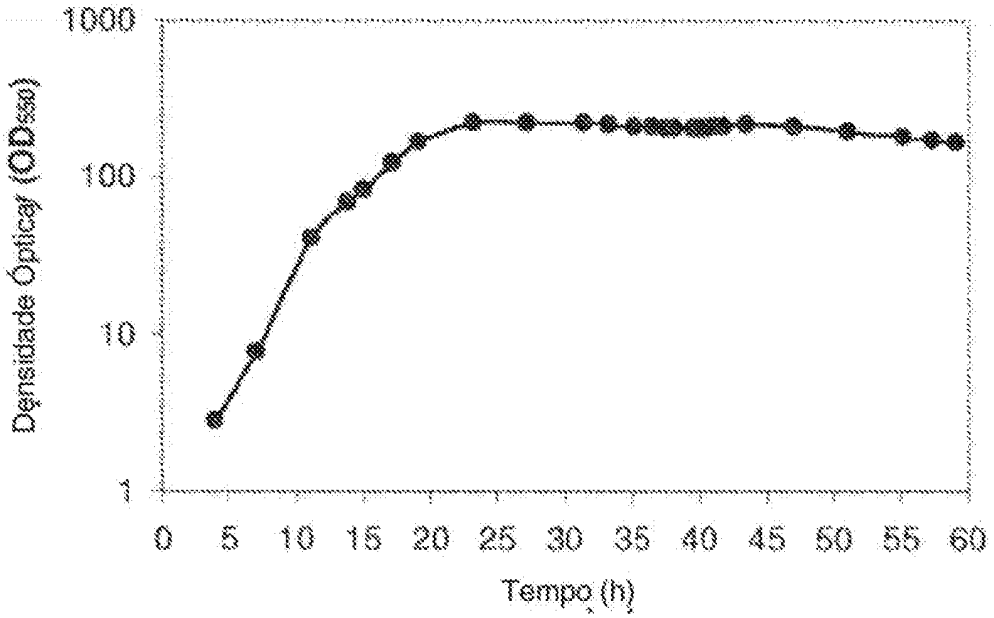

1000
100
10
1
Densidade Óptica (OD600)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
Tempo (h)

Fig. 94

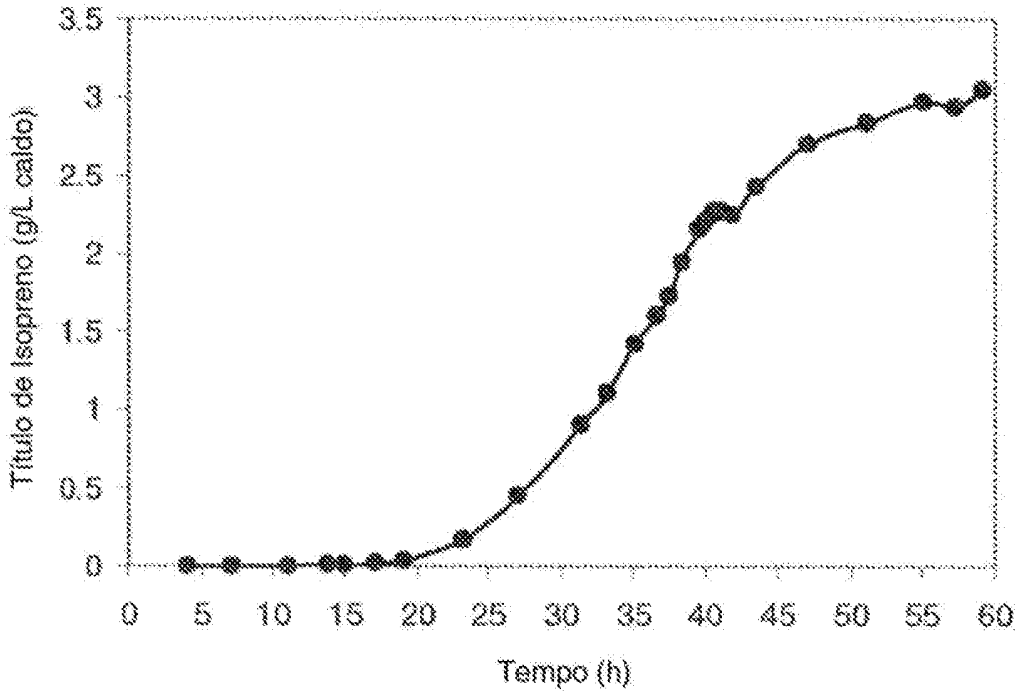

Título de Isopreno (g/L caldo)
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
3.5
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
Tempo (h)

Fig. 95

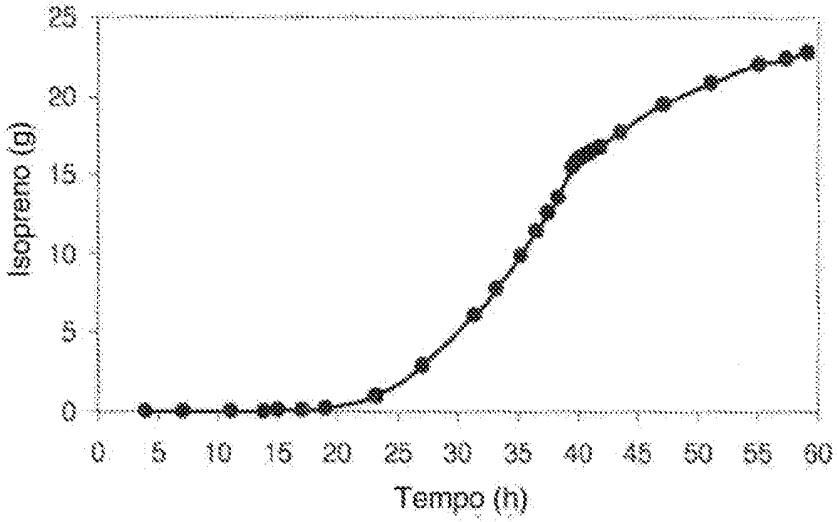


Fig. 96

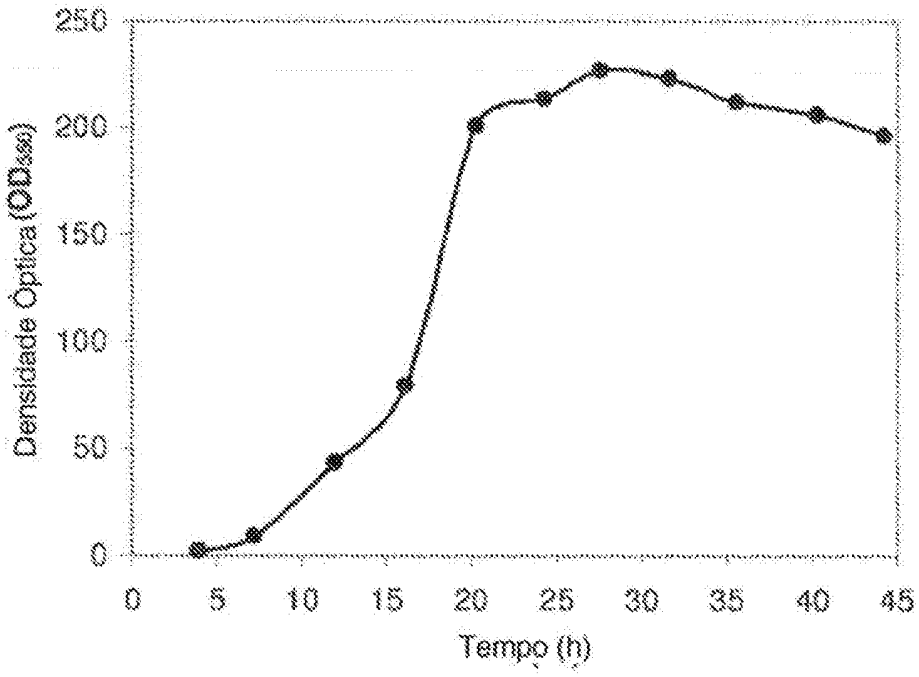

250
200
150
100
50
0
Densidade Óptica (OD600)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
Tempo (h)

Fig. 97

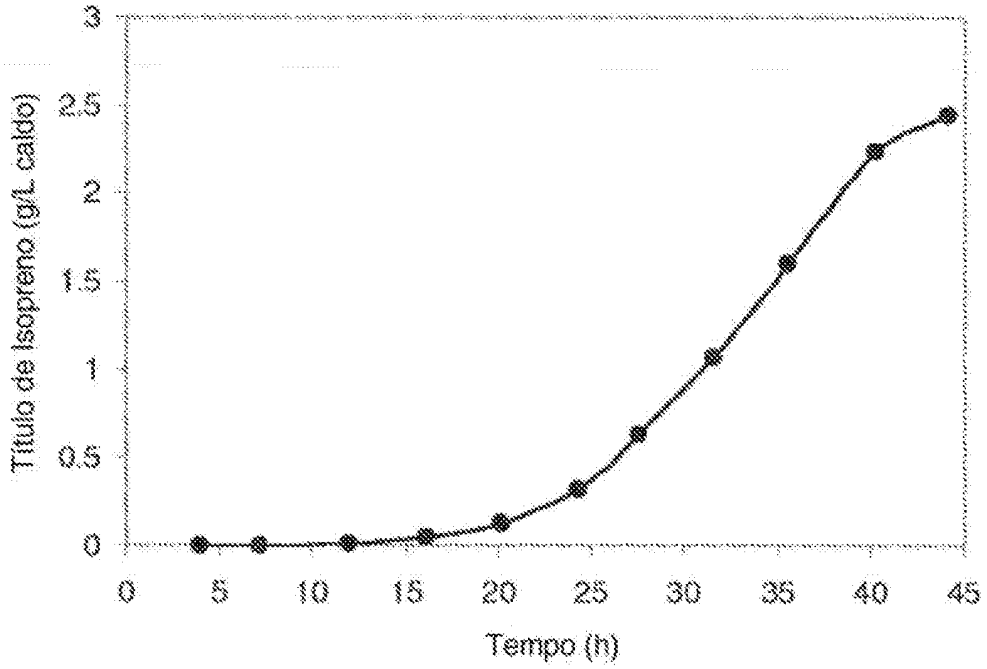

Título de Isopreno (g/L caldo)
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
Tempo (h)

Fig. 98

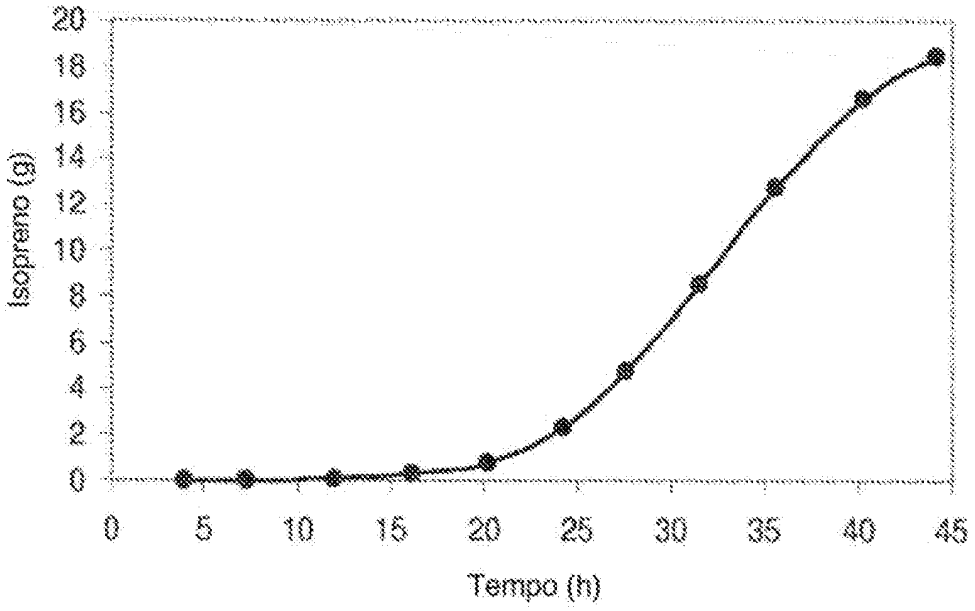

Isopreno (g)
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
Tempo (h)

Fig. 99

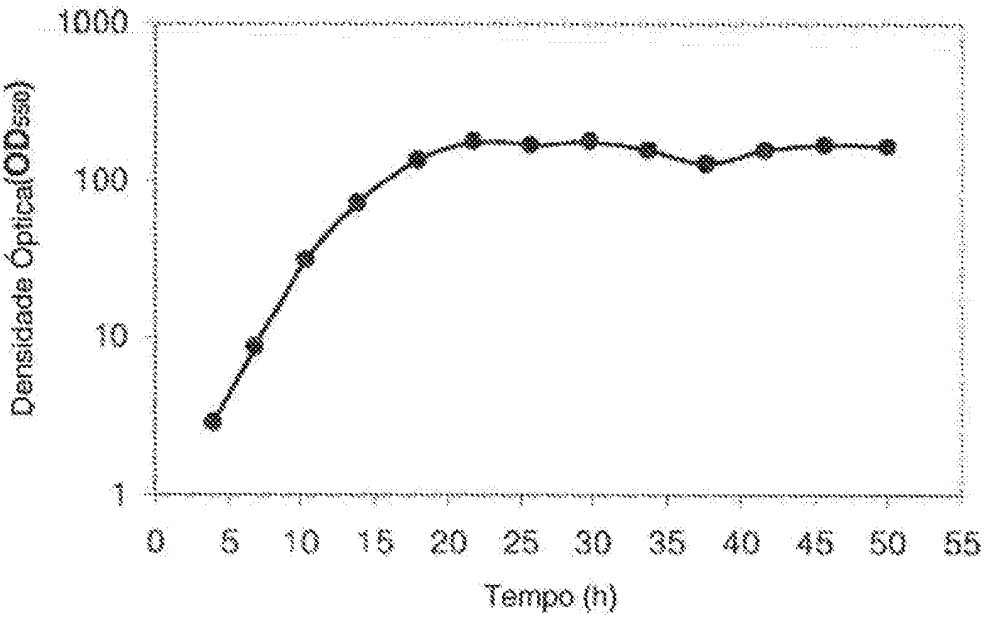

1000
100
10
1
Densidade Óptica(OD600)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
Tempo (h)

Fig. 100

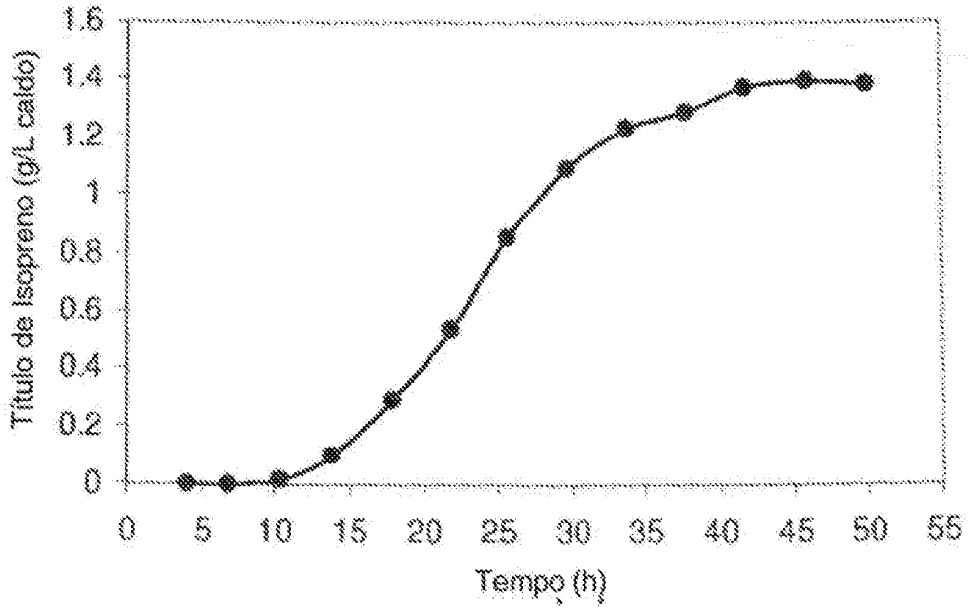

Título de Isopreno (g/L caldo)
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
Tempo (h)

Fig. 101

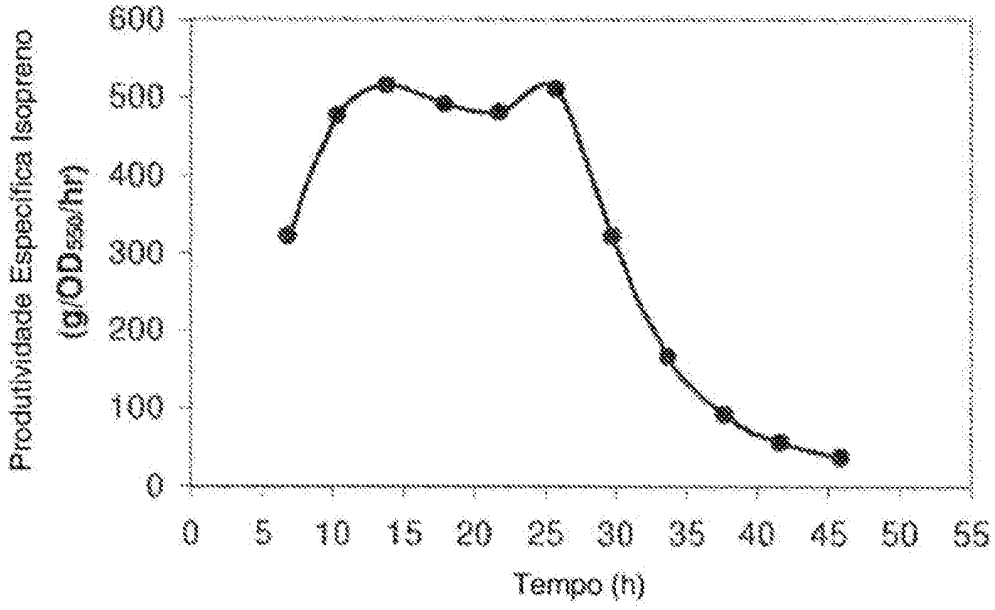

Produtividade Específica Isopreno
(g/OD550/hr)
600
500
400
300
200
100
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
Tempo (h)

Fig. 102

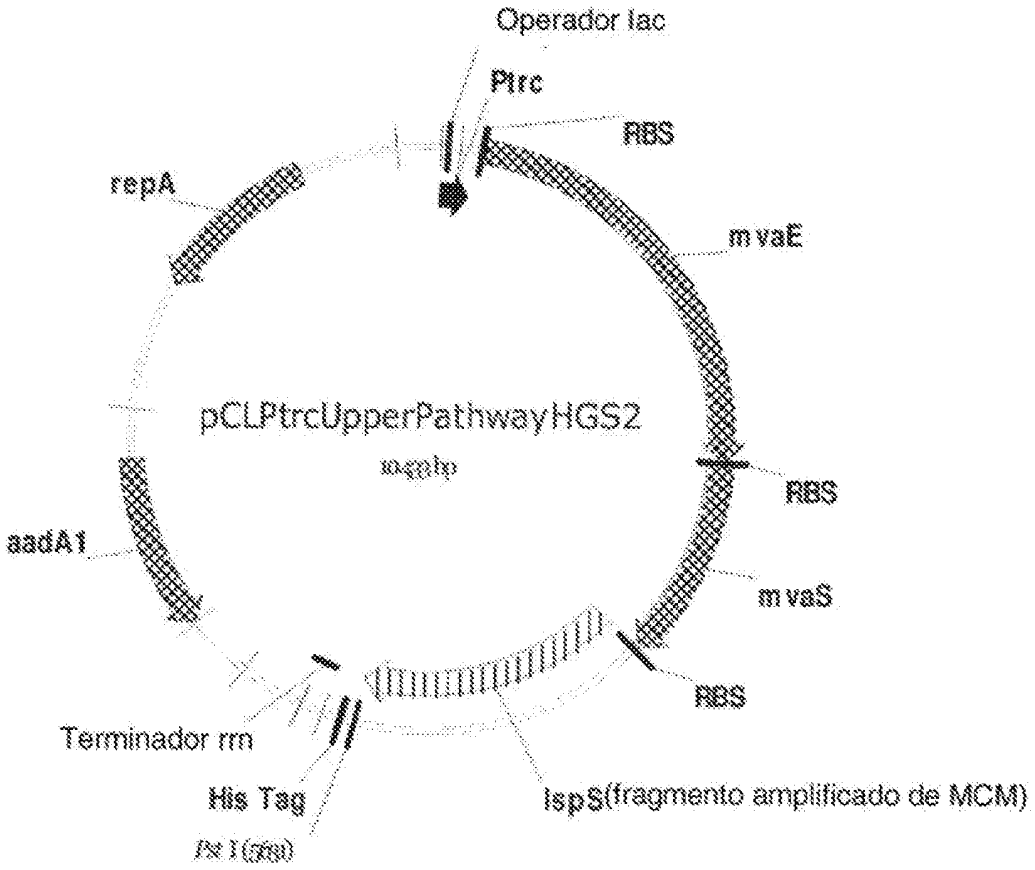

Operador lac
Ptrc
RBS
repA
mvaE
pCLPtrcUpperPathwayHGS2
RBS
aadA1
mvaS
RBS
Terminador rrn
His Tag
IspS(fragmento amplificado de MCM)

Fig. 103A

ccgtcttactgtcgggaattcgcgttggccgattcattaatgcagattctgaaatgagctgttgacaattaatcatccggctcgt
ataatgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagcgccgctgagaaaaagcgaagcggcactgctctt
taacaatttatcagacaatctgtgtgggcactcgaccggaattatcgattaacttattatttaaaaattaaagaggtatatattaat
gtatcgattaaataaggaggaataaaccatggatccgagctcaggaggtaaaaaaaacatgaaaacagtagttattattgat
gcattacgaacaccaattggaaaatataaaggcagcttaagtcaagtaagtgccgtagacttaggaacacatgttacaaca
caacttttaaaaagacattccactatttctgaagaaattgatcaagtaatcttggaaatgtttacaagctggaaatggccaaa
atcccgcacgacaaatagcaataaacagcggtttgtctcatgaaatttccgcaatgacggttaatgaggtctgcggatcagg
aatgaaggccgttatttggcgaaacaattgattcaattaggagaagcggaagttttaattgctggcgggattgagaatatgtc
ccaagcacctaaattacaacgttttaattacgaaacagaaagctacgatgcgccttttctagtatgatgtatgatggattaacg
gatgcctttagtggtcaggcaatgggcttaactgctgaaaatgtggccgaaaagtatcatgtaactagagaagagcaagatc
aattttctgtacattcacaattaaaagcagctcaagcacaagcagaagggatattcgctgacgaaatagccccattagaagt
atcaggaacgcttgtggagaaagatgaagggattcgccctaattcgagcgttgagaagctaggaacgcttaaaacagttttt
aaagaagacggtactgtaacagcagggaatgcatcaaccattaatgatgggcttctgcttgattattgctcacaagaatat
gccgaagcacacggtcttccttatttagctattattcgagacagtgtggaagtcggtattgatccagcctatatgggaatttcgcc
gattaaagccattcaaaaactgttagcgcgcaatcaacttactacggaagaaattgatctgtatgaaatcaacgaagcattg
cagcaacttcaatcgtggtccaaagagaactggcttaccagaggaaaaggtcaacatttatggtggcggtatttcattaggtc
atgcgattggtgccacaggtgctcgtttattaacgagtttaagttatcaattaaatcaaaaagaaaagaaatatggagtggcttc
tttatgtatcggcggtggcttaggactcgctatgctactagagagacctcagcaaaaaaaaaacagccgatttttatcaaatga
gtcctgaggaacgcctggcttctcttcttaatgaaggccagatttctgctgatacaaaaaaagaatttgaaaatacggctttatct
tcgcagattgccaatcatatgattgaaaatcaaatcagtgaaacagaagtgccgatgggcgttggcttacatttaacagtgga
cgaaactgatttatttggtaccaatggcgacagaagagccctcagttattgcggcttgagtaatggtgcaaaaatagcacaa
ggatttaaaacagtgaatcaacaacgcttaatgcgtggacaaatogttttttacgatgttgcagatccgagtcattgattgata
aactacaagtaagagaagcggaagttttcaacaagcagagttaagttatccatctatcgttaaacggggcggcggcttaag
agatttgcaatatcgtacttttgatgaatcatttgtatctgtcgacttttagtagatgttaaggatgcaatgggggcaaatatcgtta
acgctatgttggaaggtgtggccgagttgttccgtgaatggttgcggagcaaaagatttattcagtatttaagtaattatgcca
cggagtcggttgttacgatgaaaacggctattccagtttcacgtttaagtaagggagcaatggccgggaaattgctgaaaa
aattgtttagcttcacgctatgcttcattagatcctatcgggcagtcacgcataacaaaggaatcatgaatggcattgaagctg
tagtttagctacaggaaatgatacacgcgctgttagcgcttctgtcatgcttttgcggtgaaggaaggtcgctaccaaggcttg
actagttggacgctggatggcgaacaactaattggtgaaatttcagttccgctgctttagccacggttggcggtgccacaaaa
gtcttacctaaatctcaagcagctgctgatttgttagcagtgacggatgcaaaagaactaagtcgagtagtagcggctgttggt
ttggcacaaaatttagcggcgttacgggccttagtctctgaaggaattcaaaaaggacacatggctctacaagcacgttcttta
gcgatgacggtcggagctactggtaaagaagttgaggcagtcgctcaacaattaaaacgtcaaaaaacgatgaaccaag
accgagccatggctatttaaatgatttaagaaaacaataaaggaggtaaaaaaacatgacaattgggatgataaaattag
ttttttgtgccccttattatattgatatgacggcactggctgaagccagaaatgtagaccctggaaaatttcatattggtattggg
caagaccaaatggcggtgaacccaatcagccaagatattgtgacattgcagccaatgccgcagaagcgatcttgaccaa
agaagataaagaggccattgatatggtgattgtcgggactgagtccagtatcgatgagtcaaaagcggccgcagttgtctta
catcgtttaatggggattcaaccttcgctcgctcttcgaaatcaaggaagcttgttacggagcaacagcaggcttacagttag
ctaagaatcacgtagcctacatccagataaaaaagtcttggtcgtagcggcagatattgcaaaatatggcttaaatctggcg
gtgagcctacacaaggagctgggcggttgcaattgttagttgctagtgaaccgcgcatttggcttaaaagaggataatgtg
atgctgacgcaagatatctatgacttttggcgtccaacaggccaccgtatcctatggtcgatggtccttgtcaaacgaaacct
acatccaatcttttgcccaagtctgggatgaacataaaaaacgaacggtctgatttgcagattatgatgctttagcgttccat
attccttacacaaaaatgggcaaaaaagccttattagcaaaaatctccgaccaaactgaagcagaacaggaacgaatttta
gccgttatgaagaaagtatcgtctatagtcgtcgtaggaaaactgtatacgggttcacttatctgggactcatttccttttag
aaaatgcaacgacttaaccgcaggcaatcaaattggttattcagttatggttctggtgctgtcgctgaatttttcactggtgaatt
agtagctggttatcaaaatcatttacaaaaagaaactcatttagcactgctggataatcggacagaacttctatcgctgaatat
gaagccatgtttgcagaaacttagacacagacattgatcaaacgtta

Fig. 103B

gaagatgaattaaaatatagtatttctgctattaataataccgttcgttcttatcgaaactaaagatctgcatcctgcattcgccct
taggaggtaaaaaaaacatgtgtgcgacctcttctcaatttactcagattacgagcataatttccgtcgttccgcaaactatc
agccaaacctgtggaatttcgaattcctgcaatccctggagaacgacctgaaagtggaaaagctggaggagaaagcgga
ccaaactggaggaagaagttcgctgcatgatcaaccgtgtagacacccagccgctgtccctgctggagctgatcgacgat
gtgcagcgcctgggtctgacctacaaatttgaaaaagacatcattaaagccctggaaaacatcgtactgctggacgaaaaa
caaaaagaacaaatctgacctgcacgcaaccgctctgtcttccgtctgctgcgtcagcacggttcgaggtttctcaggatg
ttttgagcgttcaaggataaagaaggtggtttcagcggtgaactgaaaggtgacgtccaaggcctgctgagcctgtatga
agcgtctacctgggtttcgagggtgagaacctgctggaggaggcgctacctttttccatcaccccacctgaagaacaacct
gaaagaaggcattaataccaaggttgcagaacaagtgagccacgcctggaactgccatatcaccagcgtctgcaccg
tctggaggcacgttggttcctggataaatacgaaccgaaagaaccgcatcaccagctgctgctggagctggcgaagctg
gattttaacatggtacagaccctgcaccagaaagagctgcaagatctgtccgctggtggaccgagatgggcctggctag
caaactggatttgtacgcgaccgcctgatggaagtttatttctgggcactgggtatggcgccagaccccgcagtttggtgaat
gtcgcaaagctgttactaaaatgtttggtctggtgacgatcatcgatgacgtgtatgacgtttatggcactctggacgaaactgc
aactgttcaccgatgctgtagagcgcgtgggacgttaacgctattaacaccctgccggactatatgaaaactgtgtttcctggca
ctgtacaacaccgttaacgacacgtcctattctatttctgaaagagaaaggtcataacaacctgtcctatctgacgaaaagct
ggcgtgaactgtgcaaagcctttctgcaagaggcgaaatggtccaacaacaaaattatccggctttctccaagtacctgg
aaaacgccagcgtttcctcctccggtgtagcgctgctggcgcgtcttactttccgtatgccagcagcaggaagacatctcc
gaccacgcgctgcgttccctgaccgacttccatggtctggtgcgttctagctgcgttatcttccgcctgtgcaacgatctggcc
acctctgcggcggagctggaacgtggcgagactaccaattctatcattagctacatgcacgaaaacgatggtaccagcg
aggaacaggcccgcgaagaactgcgtaaactgatcgacgccgaatggaaaaagatgaatcgtgaacgcgttagcgac
tccaccctgctgcctaaagcgttcatggaaatcgcagttaacatggcacgtgtttcccactgcacctaccagtatggcgatg
gtctgggtcgcccagactacgcgactgaaaacccgcatcaaactgctgctgattgacccttcccgattaaccagctgatgta
tgtctaactgcagctggtaccatatgggaattcgaagcttgggcccgaacaaaaactcatctcagaagaggatctgaatag
cgccgtcgaccatcatcatcatcatcattgagtttaaacggtctccagcttggctgttttggcggatgagagaagattttcagc
ctgatacagattaaatcagaacgcagaagcggtctgataaaacagaatttgcctggcggcagtagcgcggtggtcccac
ctgaccccatgccgaactcagaagtgaaacgccgtagcgccgatggtagtgtggggtctccccatgcgagagtaggga
actgccaggcatcaaataaaacgaaaggctcagtcgaaagactgggccttcgttttatctgttgtttgtcggtgaacgctctc
ctgagtaggacaaatccgccgggagcggatttgaacgttgcgaagcaacggcccggagggtggcgggcaggacgcc
cgccataaactgccaggcatcaaattaagcagaaggccatcctgacggatggcctttttgcgtttctacaaactcttttgttta
tttttctaaatacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataatctggcgtaatagcgaag
aggcccgcaccgatcgcccttcccaacagttgcgcagcctgaatggcgaatggcgcctgatgcggtattttctccttacgca
tctgtgcggtatttcacaccgcatatggtgcactctcagtacaatctgctctgatgccgcatagttaagccagccccgacacc
cgccaacacccgctgacgagcttagtaaagccctcgctagattttaatgcggatgttgcgattacttcgccaactattgcgat
aacaagaaaaagccagcctttcatgatatatctcccaatttgtgtagggcttattatgcacgcttaaaaataataaaagcag
acttgacctgatagtttggctgtgagcaattatgtgcttagtgcatctaacgcttgagttaagccgcgccgcgaagcggcgtc
ggcttgaacgaattgttagacattatttgccgactaccttggtgatctcgcctttcacgtagtggacaaattcttccaactgatct
gcgcgcgaggccaagcgatcttcttcttgtccaagataagcctgtctagcttcaagtatgacgggctgatactgggccggc
aggcgctccattgcccagtcggcagcgacatccttcggcgcgatttgccggttactgcgctgtaccaaatgcgggacaac
gtaagcactacatttcgctcatcgccagcccagtcgggcggcgagttccatagcgttaaggtttcatttagcgcctcaaatag
atcctgttcaggaaccggatcaaagagttcctccgccgctggacctaccaaggcaacgctatgttctcttgcttttgtcagca
agatagccagatcaatgtcgatcgtggctggctcgaagatacctgcaagaatgtcattgcgctgccattctccaaattgcag
ttcgcgcttagctggataacgccacggaatgatgtcgtcgtgcacaacaatggtgacttctacagcgcggagaatctcgct
ctctccagggaagccgaagtttccaaaaggtcgttgatcaaagctcgccgcgttgtttcatcaagccttacggtcaccgta
accagcaaatcaatatcactgtgtggcttcaggccgccatccactgcggagccgtacaaatgtacggccagcaacgtcg
gttcgagatggcgctcgatgacgccaactacctctgatagttgagtcgatacttcggcgatcaccgcttccctcatgatgttta
acttgtttttagggcgactgccctgctgcgtaacatcgttgctgctccataacatcaaacatcgacccacggcgtaacgcgct
tgctgcttggat

Fig. 103C

gcccgaggcatagactgtaccccaaaaaaacagtcataacaagccatgaaaaccgccactgcgccgttacca
ccgctgcgttcggtcaaggttctggaccagttgcgtgagcgcatacgctacttgcattacagcttacgaaccgaaca
ggcttatgtccactgggttcgtgccttcatccgtttccacggtgtgcgtcacccggcaaccttgggcagcagcgaagt
cgaggcatttctgtcctggctggcgaacgagcgcaaggtttcggtctccacgcatcgtcaggcattggcggccttgc
tgttcttctacggcaaggtgctgtgcacggatctgccctggcttcaggagatcggaagacctcggccgtcgcggcg
cttgccggtggtgctgaccccggatgaagtggttcgcatcctcggttttctggaaggcgagcatcgtttgttcgcccag
cttctgtatggaacgggcatgcggatcagtgagggtttgcaactgcgggtcaaggatctggatttcgatcacggcac
gatcatcgtgcgggagggcaagggctccaaggatcgggccttgatgttacccgagagcttggcacccagcctgc
gcgagcaggggaattaattcccacgggttttgctgcccgcaaacgggctgttctggtggttgctagtttgttatcagaat
cgcagatccggcttcagccggtttgccggctgaaagcgctatttcttccagaattgccatgattttttccccacgggag
gcgtcactggctcccgtgttgtcggcagcttgatcgataagcagcatcgcctgtttcaggctgtctatgtgtgactgtt
gagctgtaacaagttgtctcaggtgttcaatttcatgttctagttgctttgttttactggtttcacctgttctattaggtgttaca
tgctgttcatctgttacattgtcgatctgttcatggtgaacagctttgaatgcaccaaaaactcgtaaaagctctgatgta
tctatctttttttacaccgtttcatctgtgcatatggacagtttttccttgatatgtaacggtgaacagttgttctacttttgtttg
ttagtcttgatgcttcactgatagatacaagagccataagaacctcagatccttccgtatttagccagtatgttctctagt
gtggttcgttgtttttgcgtgagccatgagaacgaaccattgagatcatacttactttgcatgtcactcaaaaaattttgcct
caaaactggtgagctgaatttttgcagttaaagcatcgtgtagtgttttcttagtccgttatgtaggtaggaatctgatgt
aatggttgttggtattttgtcaccattcatttttatctggttgttctcaagttcggttacgagatccatttgtctatctagttcaa
cttggaaaatcaacgtatcagtcgggcggcctcgcttatcaaccaccaatttcatattgctgtaagtgtttaaatctttta
cttattggtttcaaaacccattggttaagccttttaaactcatggtagttatttttcaagcattaacatgaacttaaatttcatc
aaggctaatctctatatttgccttgtgagtttcttttgtgttagttctttttaataaccactcataaatcctcatagagtatttgtt
ttcaaaagacttaacatgttccagattatattttatgaatttttttaactggaaaagataaggcaatatctctttcactaaaaa
actaatttctaatttttcgcttgagaacttggcatagtttgtccactggaaaatctcaaagcctttaaccaaaggattcctg
atttccacagttctcgtcatcagctctctggttgctttagctaatacaccataagcattttccctactgatgttcatcatctg
agcgtattggttataagtgaacgataccgtccgttctttccttgtagggtttcaatcgtggggttgagtagtgccacac
agcataaaattagcttggtttcatgctccgttaagtcatagcgactaatcgctagttcatttgctttgaaaacaactaaatt
cagacatacatctcaattggtctaggtgattttaatcactataccaattgagatgggctagtcaatgataattactagtc
cttttccttgagttgtgggtatctgtaaattctgctagaccttttgctggaaaacttgtaaattctgctagaccctctgtaaat
tccgctagaccttttgtgtttttttttgtttatattcaagtggttataatttatagaataaagaaagaataaaaaaagataa
aaagaatagatcccagccctgtgtataactcactacttagtcagttccgcagtattacaaaaggatgtcgcaaacg
ctgttttgctcctctacaaaacagaccttaaaaccctaaaggcttaagtagcaccctcgcaagctcgggcaaatcgc
tgaatattccttttgtctccgaccatcaggcacctgagtcgctgtctttttcgtgacattcagttcgctgcgctcacggctc
tggcagtgaatgggggtaaatggcactacaggcgccttttatggattcatgcaaggaaactacccataatacaag
aaaagcccgtcacgggcttctcagggcgttttatggcgggtctgctatgtggtgctatctgactttttgctgttcagcagt
tcctgccctctgattttccagtctgaccacttcggattatcccgtgacaggtcattcagactggctaatgcacccagta
aggcagcggtatcatcaacaggctta

(SEQ ID NO:87)

Fig. 104

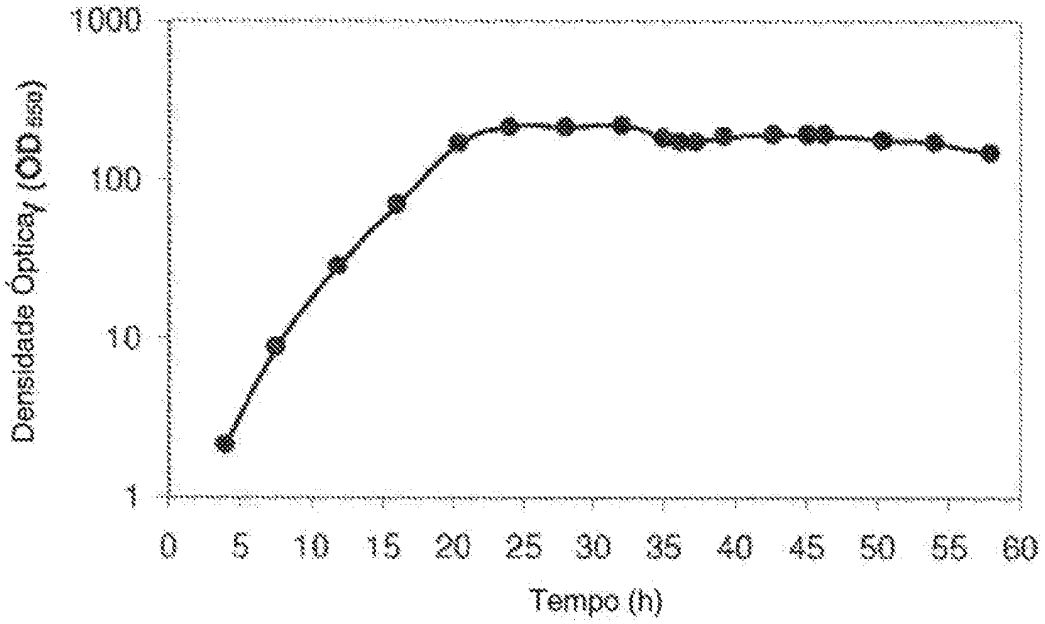

1000
100
10
1
Densidade Óptica (OD600)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
Tempo (h)

Fig. 105

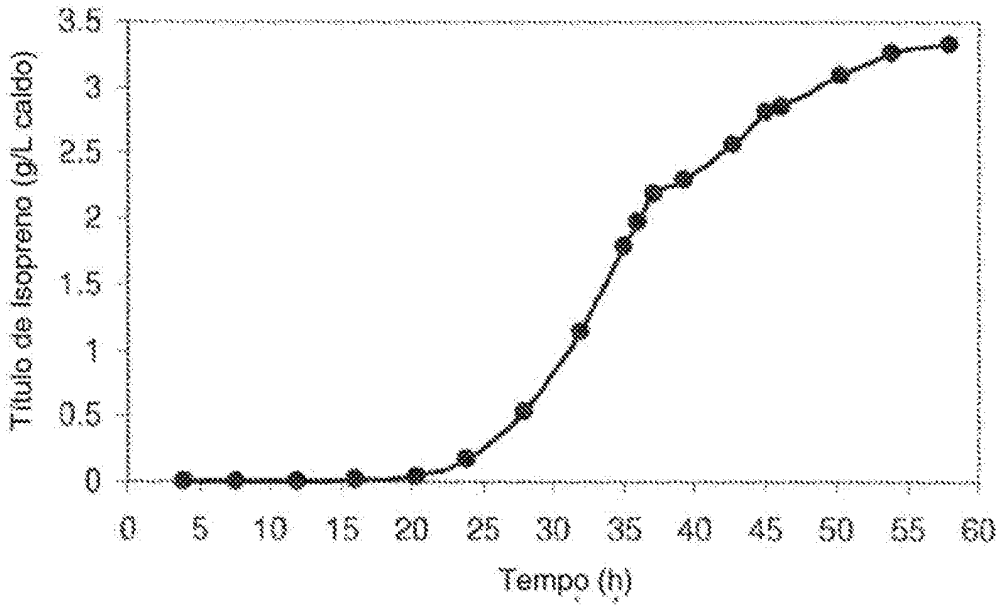

Título de isopreno (g/L caldo)
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
3.5
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
Tempo (h)

Fig. 106

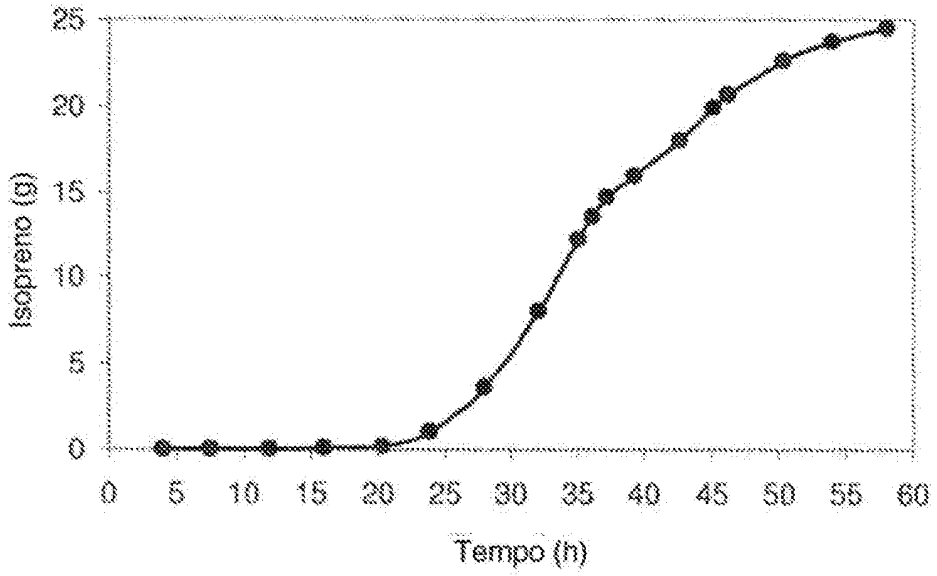


Fig. 107

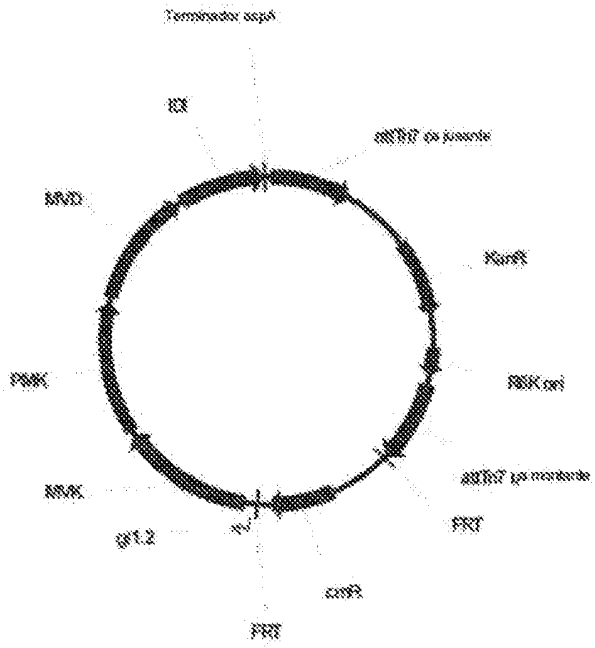


Fig. 108A



Fig. 108B

aagagatgacagaaaaatttcatctgtgacagagaaaaagtagccgaagatgacggttgtcacatggagtggcagga
tgtttgattaaaagcaattaaccctcactaaagggcggccgcgaagtcctattctctagaaagtataggaacttcatctaccg
ggtagggaggcgctttcccaaggcagtctggagcatgcgctttagcagccccgctgggcactggcgctacacaagtgg
cctctggcctgcacacatttccacatccaccggtaggcgccaaccggctccgttctttggtggcccctcgcgccaccttccac
tcctcccctagtcaggaagttcccccccgccccgcagctcgcgtcgtgcaggacgtgacaaatggaagtagcacgtctcac
tagtctcgtgcagatggacagcaccgctgagcaatggaagcgggtaggcctttggggcagcggccaatagcagctttgctc
cttcgctttctgggctcagaggctgggaaggggtgggtccgggggcgggctcaggggcgggctcaggggcggggcgggc
gcccgaaggtcctccggaggcccggcattctgcacgcttcaaaagcgcacgtctgccgcgctgttctcctccttcctcatctccg
ggcctttcgacctgcagcagcacgtgttgacaattaatcatcggcatagtatatcggcatagtatatactacgacaaggtgagga
actaaaaccatggagaaaaaaaatcactggatataccaccgttgatatatcccaatggcatcgtaaagaacattttgaggcattt
cagtcagttgctcaatgtacctataaccagaccgttcagctggatattacggcctttttaaagaccgtaaagaaaaataagca
caagttttatccggcctttattcacattctgcccgcctgatgaatgctcatccggaattccgtatggcaatgaaagacggtgagc
tggtgatatgggatagtgttcaccctgttacaccgtttccatgagcaaactgaaacgttttcatcgctctggagtgaataccac
gacgatttccggcagtttctacacatatattcgcaagatgtggcgtgttacggtgaaaacctggcctatttccctaaagggtttatt
gagaatatgtttttcgtctcagccaatccctgggtgagtttcaccagttttgatttaaacgtggccaatatggacaacttcttcgcc
cccgttttcaccatgggcaaatattatacgcaaggcgacaaggtgctgatgccgctggcgattcaggttcatcatgccgtttgt
gatggcttccatgtcggcagaatgcttaatgaattacaacagtactgcgatgagtggcagggcggggcgtaagcgggactct
ggggttcgaataaagaccgaccaagcgacgtctgagagctccctggcgaattcggtaccaataaaagagcttatttcatg
atctgtgtgttggttttgtgtgcggcggcggaagtttctatttctagaaagtataggaacttcctcgagccctatagtgagtcgtatt
agccctgacgatgccacatcctgagcgaaataattcaaccactaatgtgagcggataacacaaggaggaaacagctatgt
cattaccgttcttaacttctgcaccgggaaaggttatattttttggtgaaacactctgctgtgtacaacaagcctgccgtcgctgcta
gtgtgtctgcgttgagaacctacctgctaataagcgagtcatctgcaccagatactatgaatggacttccggacattagcttt
aatcataagtggtccatcaatgatttcaatgccatcaccgaggatcaagtaaactcccaaaaatttggccaaggctcaacaa
gccaccgatggcttgtctcaggaactcgttagtctttggatccgttgttagctcaactatccgaatcctttccactaccatgcagc
gttttgttcctgtatatgttgttttgcctatgccccatgccaagaatattaagttttcttaaagtctacttttacccatcggtgctgggtt
gggctcaagcgcctctatttctgtatcactggccttagctatggcctacttgggggggttaataggatctaatgacttggaaaaag
ctgtcagaaaaacgataagcatatagtgaatcaatgggccttcataggtgaaaagtgtattcacggtacccctttcaggaatag
ataacgctgtggccacttatggtaatgcctgctatttgaaaaaagactcacataatggaacaataaaacacaaacaaatttaagt
tcttagatgatttcccagccatttccaatgatcctaacctatactagaatttccaaggtctacaaaagatcttgttgctcgcgttcgtgt
gttggtcaccgagaaatttcctgaagttatgaagccaatttctagatgccatgggtgaatgtgccctacaaggcttagagatcat
gactaagttaagtaaatgtaaaggcaccgatgacgaggctgtagaaactaataatgaactgtatgaacaactattggaaatg
ataagaataaaatcatggactgcttgtctcaatcggtgtttctcatcctggattagaacttattaaaaatctgagcgatgatttgaga
attggctccacaaaaacttaccggtgctggtggcggcggtgctcttgacttgttacgaagagacatttactcaagagcaaattg
acagcttcaaaaagaaattgcaagatgatttagttacgagacatttgaaacagactgggtgggactggctgctgttgttaag
cgcaaaaaaattgaataaagatcttaaaatcaaatccctagtatttccaatattgaaaataaaactaccacaaagcaacaa
attgacgatctattattgccaggaaacacgaatttaccatggacttcataagctaatttgcgataggcctgcaccctaaggag
gaaaaaaaacatgtcagagttgagagccttcagtgcccagggaaagcgttactagctggtggatatttagtttagatacaaa
atatgaagcatttgtagtcggattatcggcaagaatgcatgctgtagcccatcctttacggttcatttgcaaagggtctgataagttg
aagtgcgtgtgaaaagtaaacaatttaaagatgggagtggctgtaccatataagtcctaaaagtggcttcattcctgttcgat
aggcggatctaagaaccttcattgaaaaagttatcgctaacgtatttagctacttttaaacctaacatggacgactactgcaat
agaaacttgttcgttattgatatttttctctgatgatgcctaccattctcaggaggatagcgttaccgaacatcgtggcaacagaag
attgagttttcatttcgcacagaatgaagaagttcccaaaacagggctgggctcctcggcaggttagtcacagttttaactaca
gctttggctcctttttgtatcggaccttggaaaatatgtagacaaatatagagaagttatcataatttagcacaagttgctcatt
gtcaagctcagggtaaaattggaagcgggtttgatgtagcgggcggcagcatatggatctatcagatatagaagatttcccacc
cgcattaatctctaatttgccagatatttggaagtgctacttacggcagtaaacttggcgcatttggttgatgaagaagactggaat
attacgattaaaagtaaccatttaccttc

Fig. 108C

gggattaacttatggatgggcgatattaagaatggttcagaaacagtaaaactggtccagaaggtaaaaaattggtatgatt
cgcatatgccagaaagcttgaaaatatatacagaactgatcatgcaaattctagatttatggatggactatctaaactagatc
gcttacacgagactcatgacgattacagcgatcagatatttgagtcttgagaggaatgactgtacctgtcaaaagtatcctg
aaatcacagaagttagagatgcagttgccacaattagacgttccttagaaaaataactaaagaatctggtgccgatatcga
acctccgtacaaactagcttattggatgattgccagacctaaaaggagttcttactgcttaatacctggtgctggttggttatga
cgccattgcagtgattactaagcaagatgttgatcttagggctcaaacgctaatgacaaaagatttttctaaggttcaatggctg
gatgtaactcaggctgactggggtgttaggaaagaaaaagatccggaaacttatcttgataaataacttaaggtagctgcatg
cagaattcgcccttaaggaggaaaaaaaaaatgacgttacacagcatccgttaccgcacccgtcaacatcgcaaccctta
agtattgggggaaaagggacacgaagttgaatctgcccaccaattcgtccatatcagtgacttatcgcaagatgacctcag
aacgttgaccctgcggctactgcacctgagtttgaacgcgacacttgtggttaaatggagaaccacacagcatcgacaat
gaaagaactcaaaattgtctgcgcgacctacgccaattaagaaaggaaatggaatcgaaggacgcctcattgcccacatt
atctcaatggaaactccacattgtctccgaaaataacttcctacagcagctggttagcttcctccgctgctggctttgctgcatt
ggtctctgcaattgctaagttataccaattaccacagtcaacttcagaaatatctagaatagcaagaaaggggtctggttcagc
ttgtagatcgttgtttggcggatacgtggcctgggaaatgggaaaagctgaagatggtcatgattccatggcagtacaaatcg
cagacagctctgactggcctcagatgaaegctgtgtcctagttgtcagcgatattaaaaaggatgtgagttccactcagggta
tgcaattgaccgtggcaacctccgaactatttaaagaaagaattgaacatgtcgtaccaaagagatttgaagtcatgcgtaa
agccattgttgaaaaagatttcgccaccttgcaaaggaaacaatgatggattccaactcttccatgccacatgtttggactctt
tcctccaatattctacatgaatgacacttccaagcgtatcatcagttggtgccacaccattaatcagttttacggagaaacaat
cgttgcatacacgtttgatgcaggtccaaatgctgtgttgtactacttagctgaaaatgagtcgaaaactcttgcatttatctataaa
ttgtttggctctgttcctggatgggacaagaaatttactactgagcagcttgaggctttcaaccatcaattgaatcatctaacttta
ctgcacgtgaattggatcttgagttgcaaaaggatgttgccagagtgatttaaactcaagtcggttcaggccacaagaaaca
aacgaatcttgattgacgcaaagactggtctaccaaaggaataagatcaattcgctgcatcgccttaggaggtaaaaaaaa
aatgactgccgacaacaatagtatgccccatgggtgcagtatctagttacgccaaattagtgcaaaaccaaaacacctgaaga
catttggaagagtttcctgaaattatccattacaacaaagacctaataccgatctagtgagacgtcaaatgacgaaagcg
gagaaacatgttttctggtcatgatgaggagcaaattaagttaatgaatgaaaattgtattgttttggattgggacgataatgcta
ttggtgccggtaccaagaaagttgtgtcatttaatggaaaatatgaaaagggtttactacatcgtgcattctccgtctttatttttcaat
gaacaaggtgaattacttttacaacaaagagccactgaaaaaataacttccctgatcttggactaacacatgctgctctcat
ccactatgtattgatgacgaattaggtttgaagggtaagctagacgataagattaagggcgctattactgcggcggtgagaaa
actagatcatgaattaggtattccagaagatgaaactaagacaagggtaagttcacttttaaaacagaatccattacatggc
accaagcaatgaaccatgggtgaacatgaaattgattacatcctatttataagatcaacgctaaagaaaacttgactgtca
acccaaacgtcaatgaagttagagacttcaaatggtttcaccaaatgattgaaaactatgtttgctgacccaagttacaagtt
tacgccttggttaagattattgcgagaattacttattcaactggtgggagcaattagatgacctttctgaagtggaaaatgaca
ggcaaattcatagaatgctataacaacgcgtctacaaataaaaaaggcacgtcagatgacgtgccttttttcttgggcc

(SEQ ID NO:90)

Fig. 109

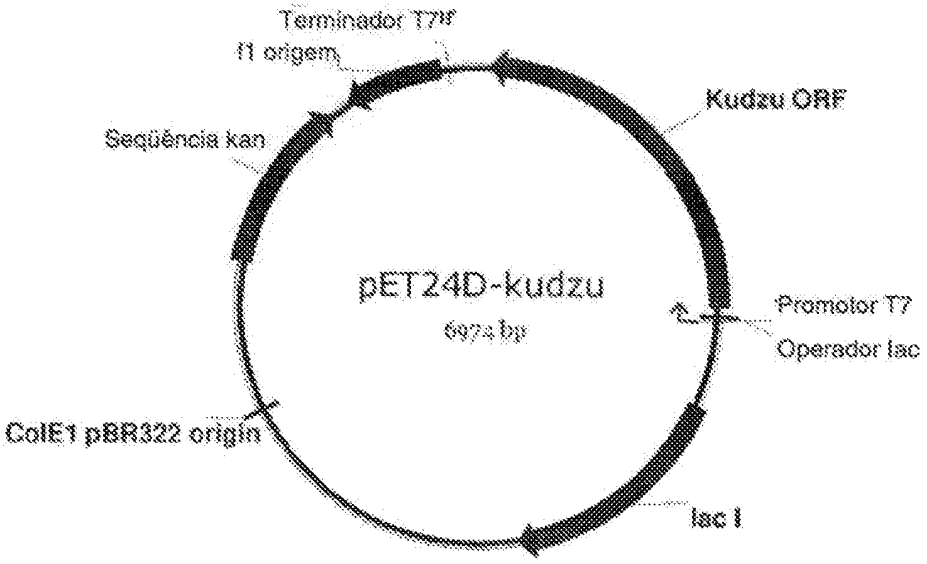

Terminador T7
f1 origem
Kudzu ORF
Seqüência kan
pET24D-kudzu
6974 bp
Promotor T7
Operador lac
ColE1 pBR322 origin
lac I

Fig. 110A

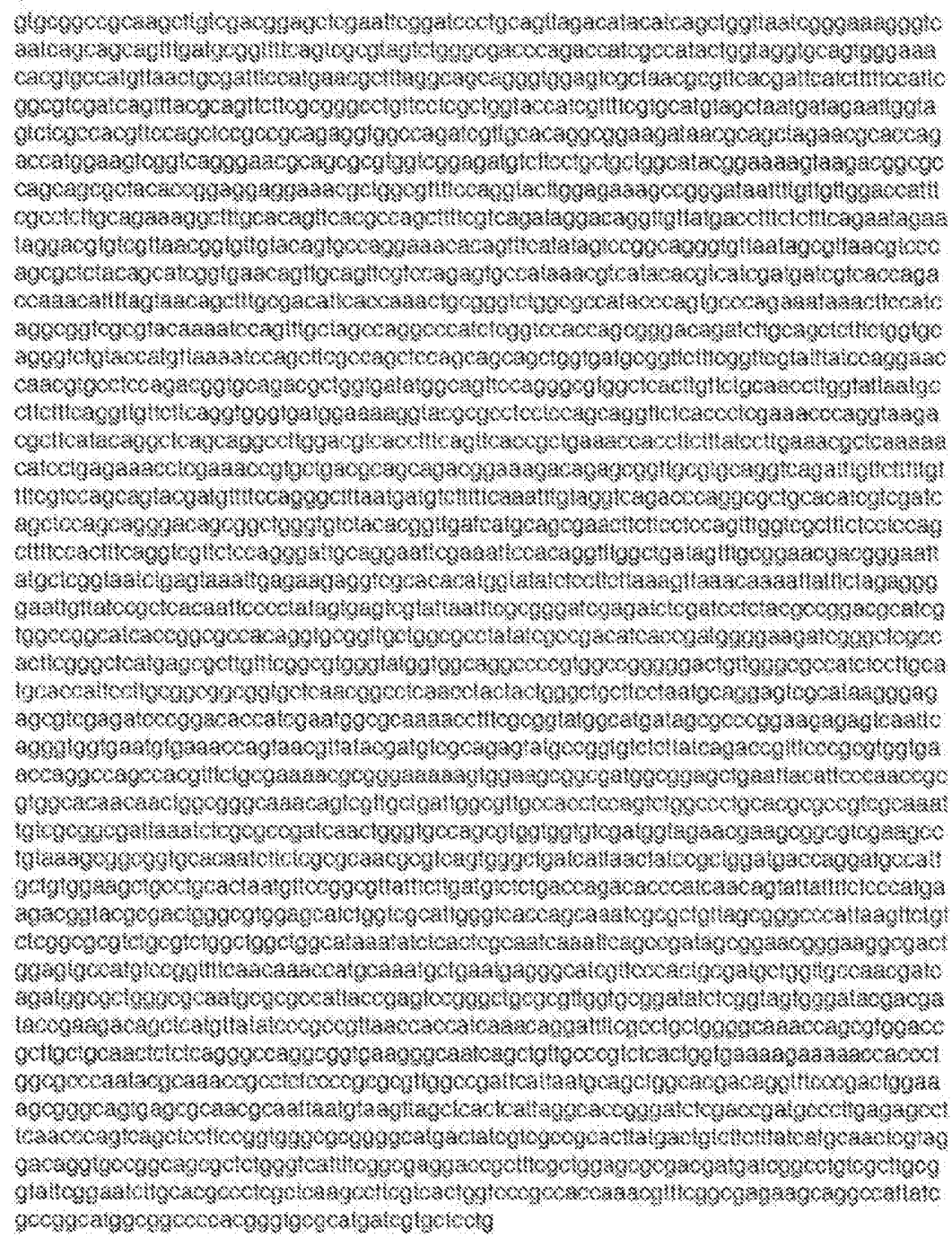


Fig. 110B

tcgttgaggaccoggctaggctggcggggttgccttactggttagcagaatgaatcaccgatacgcgagcgaacgtgaagcgact
gctgctgcaaaacgctcgcgacctgagcaacaacatgaatggtcttcggtttccgtgtttcgtaaagtctggaaacgcggaagtcag
cgccctgcaccattatgttccggatctgcatcgcaggatgctgctggctacccgtggaacacctacatctgtattaacgaagcgctg
gcattgaccctgagtgatttttctctggtcccgccgcatccataccgccagttgtttaccctcacaacgttccagtaaccgggcatgttc
atcatcagtaacccgtatcgtgagcatcctctctcgtttcatcggtatcattacccccatgaacagaaatccccccttacacggaggca
tcagtgaccaaacaggaaaaaaccgcccttaacatggcccgctttatcagaagccagacattaacgcttctggagaaactcaac
gagctggacgcggatgaacaggcagacatctgtgaatcgcttcacgaccacgctgatgagctttaccgcagctgcctcgcgcgttt
cggtgatgacggtgaaaacctctgacacatgcagctcccggagacggtcacagcttgtctgtaagcggatgccgggagcagac
aagcccgtcagggcgcgtcagcgggtgttggcgggtgtcggggcgcagccatgacccagtcacgtagcgatagcggagtgtat
actggcttaactatgcggcatcagagcagattgtactgagagtgcaccatatatgcggtgtgaaataccgcacagatgcgtaagg
agaaaataccgcatcaggcgctcttccgcttcctcgctcactgactcgctgcgctcggtcgttcggctgcggcgagcggtatcagct
cactcaaaggcggtaatacggttatccacagaatcagggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaag
gccaggaaccgtaaaaaggccgcgttgctggcgtttttccataggctccgcccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctca
agtcagaggtggcgaaacccgacaggactataaagataccaggcgtttccccctggaagctccctcgtgcgctctcctgttccga
ccctgccgcttaccggatacctgtccgcctttctcccttcgggaagcgtggcgctttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcggt
gtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaaccccccgttcagcccgaccgctgcgccttatccggtaactatcgtcttgag
tccaacccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcggtgct
acagagttcttgaagtggtggcctaactacggctacactagaaggacagtatttggtatctgcgctctgctgaagccagttaccttcg
gaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaacaaaccaccgctggtagcggtggtttttttgtttgcaagcagcagattacgcgca
gaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggatttggt
catgaacaataaaactgtctgcttacataaacagtaatacaaggggtgttatgagccatattcaacgggaaacgtcttgctctaggc
cgcgattaaattccaacatggatgctgatttatatgggtataaatgggctcgcgataatgtcgggcaatcaggtgcgacaatctatcg
attgtatgggaagcccgatgcgccagagttgtttctgaaacatggcaaaggtagcgttgccaatgatgttacagatgagatggtcag
actaaactggctgacggaatttatgcctcttccgaccatcaagcattttatccgtactcctgatgatgcatggttactcaccactgcgat
ccccgggaaaacagcattccaggtattagaagaatatcctgattcaggtgaaaatattgttgatgcgctggcagtgttcctgcgccg
gttgcattcgattcctgtttgtaattgtccttttaacagcgatcgcgtatttcgtctcgctcaggcgcaatcacgaatgaataacggtttggt
tgatgcgagtgatttgatgacgagcgtaatggctggcctgttgaacaagtctggaaagaaatgcataaacttttgccattctcaccg
gattcagtcgtcactcatggtgatttctcacttgataaccttatttttgacgaggggaaattaataggttgtattgatgttggacgagtcgg
aatcgcagaccgataccaggatcttgccatcctatggaactgcctcggtgagtttctccttcattacagaaacggcttttcaaaaat
atggtattgataatcctgatatgaataaattgcagtttcatttgatgctcgatgagtttttctaagaattaattcatgagcggatacatatttg
aatgtatttagaaaaataaacaaatagggttccgcgcacatttccccgaaaagtgccacctgaaattgtaaacgttaatatttttgtta
aaattcgcgttaaatttttgttaaatcagctcattttttaaccaatagggcgaatcggcaaaatcccttataaatcaaaagaatagac
cgagatagggttgagtgttgttccagtttggaacaagagtccactattaaagaacgtggactccaacgtcaaagggcgaaaaacc
gtctatcagggcgatggcccactacgtgaaccatcacccIaatcaagttttttggggtcgaggtgccgtaaagcactaaatcggaa
ccctaaagggagcccccgatttagagcttgacggggaaagccggcgaacgtggcgagaaaggaagggaagaaagcgaaa
ggagcgggcgctagggcgctggcaagtgtagcggtcacgctgcgcgtaaccaccacacccgccgcgcttaatgcgccgctac
agggcgcgtcccattcgccaatccggatatagttcctcctttcagcaaaaaacccctcaagacccgtttagaggccccaagggtt
atgctagttattgctcagcggtggcagcagccaactcagcttcctttcgggctttgttagcagccggatctcagtggtggtggtggt
gctcga

(SEQ ID NO:101)

Fig. 111A

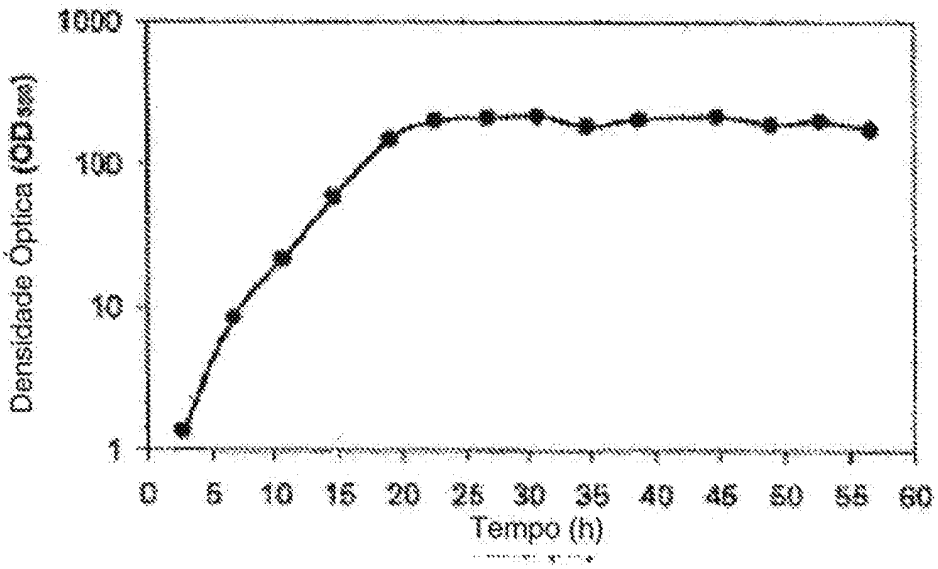

1000
100
10
1
Densidade Óptica (OD600nm)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
Tempo (h)

Fig. 111B

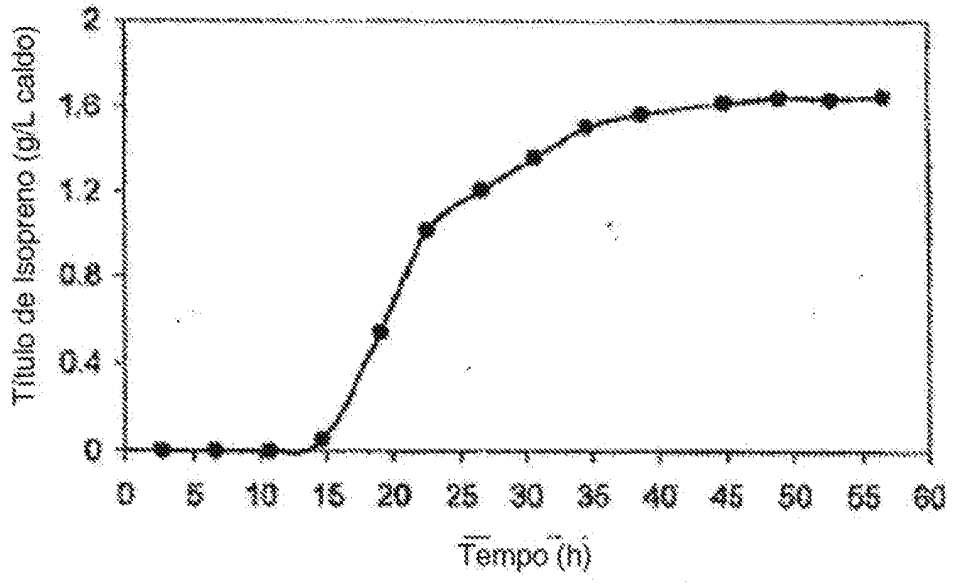

Título de Isopreno (g/L caldo)
2
1.6
1.2
0.8
0.4
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
Tempo (h)

Fig. 111C

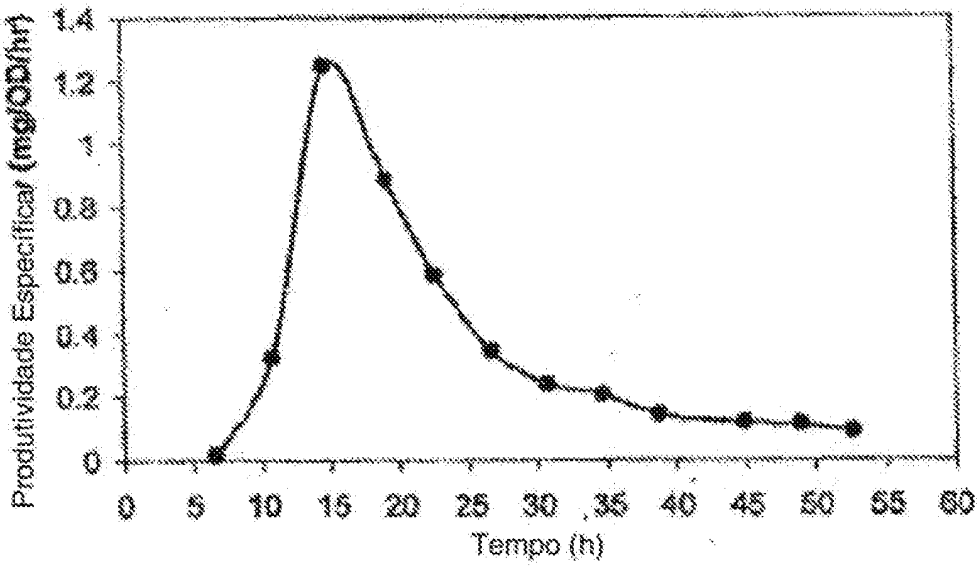
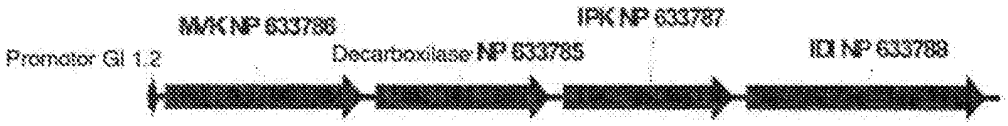

Produtividade Específica (mg/OD/hr)
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
Tempo (h)

Fig. 112A



Operon da via inferior da arquéia M. mazei

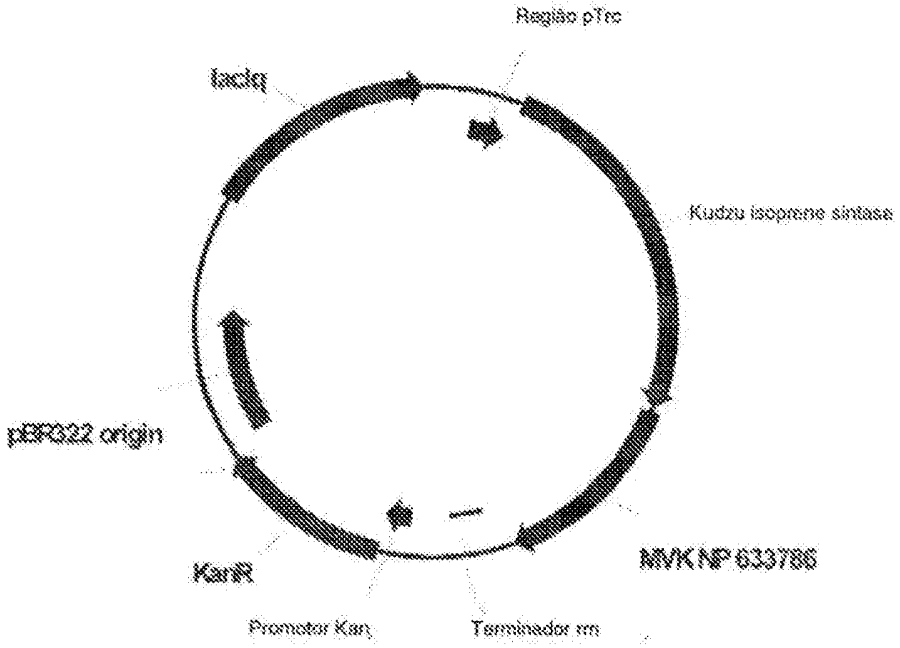
Fig. 112B

gcggccgcgcccttgacgatgccacatcctgagcaaataattcaaccactaattgtgagcggataacacaaggaggaaaacagc
catggtatcctgttctgcgccgggtaagatttacctgttcggtgaacacgccgtagtttatggcgaaaactgcaattgcgtgcggtgg
aactgcgtaccgtgttcgcgcggaacttcaatgactctatcactattcagagccagatcggccgcaccggtctggatttcgaaaag
cacccttatgtgtctgcggtaattgagaaaatgcgcaaaatctatcctattaacggtgttttctgacgtcgattccgacatcccggtgg
gctccggtctgggtagcagcgcagccgttactatcgcgtctatttggtgcgctgaacgagctgttcggcttggcctcagcctgcaaga
aatcgctaaactgggccacgaaatcgaaattaaagtacagggtgccgcgtcccctaacgatacgtatgttttctaccttcggcggcg
tggttaccatccggaacgtcgcaaactgaaaactccggactgcggcattgtgatttggcgatacccgcgttttctcctccaccaaag
agttagtagctaacgtacgtcagctgcgcgaaagctaccccggatttgatcgaaccgctgatgaccttattggcaaaatctctcgtat
cggcgaacaactggttctgtctggcgactacgcatccatcggccgcctgatgaacgtcaaccagggtctcctggacgccctgggc
gttaacatcttagaactgagccagctgatctattccgctcgtgcggcaggtgcgtttggcgctaaaatcacgggcgctggcggcggt
ggctgtatggttgcgctgacccgctccggaaaaatgcaaccaagtggcagaagcggtagcaggcgctggcggtaaagtgactatc
actaaacccgaccgagcaaggtctgaaagtagattaagcctgacttaatagctgcttatttcgccctatggtacctagtaggaggga
aaaaaacatggaaatgcgtcaacggctgtcgcaggtcaattctaccccactgcgttgcgagaaacctggaaaacgaactgaaaac
gctgcttcgaaggcctggagatccggaacaagaagtgctgggcgcagtctgtccgcacgccggttatatgtacttctggcaaagtt
gcggcgcacgtcttatgccacttctgccggaagctgatacctacgtaatcttcggcccgaacctacaccggctacggtagcctgtctc
tgtgagccgtgaaacttggaagaccccgttgggcaatatcgatgttgacctggaactggcggacggcttcctgggttccatcgtaga
tgcggatgaactcggtcacaaatacgaacactctatcgaagttcagctgccgtttctgcaatacgtttgaacgcgatttcaaaattc
tgccaatctgcatgggtatgcaagacgaagaaaccgcggtcgaagtaggtaacctgctggcggatctgatcagcgagtccggta
aacgtgctgtgatcatgcaagctctgatttcaccctatgagacggctgaacgtgccaaagaaatcgatttcgaagttattgattc
tatcctgaacttgacatctctggcatgtacgatcgcctgtatcgccgtaacgcctctgtttgcggttacggccccgatcaccgctatgct
gacggcaagcaaaaagctgggcggctctgtgccgacttgctgaaatacgcaaacagcggtgacgtgtccggtgataaagacg
ctgtggtgggctacgccgccatcatcgttgagtaagctgattaaaggtgaacagataggatttcgtcatggatcctacaaggagga
aaaaaacatgaatgctctaatgaaccggtgatctgaaactgggtggctctgctattaccgacaaaggtgcctacgaaggcgtag
ttaaggaagctgatttgctgcgcatcgcacaggaagttagcggttccgtggcaagatgatcgtggttcatggtgctggtagcttcgg
ccatacgtacgcgaagaaatacggcctggaccgtacctcgacccagagggcgcaattgttactcatgaatctgttaaaaagctc
gcctccaaagttgtaggtgctctgaatagcttcggcgtgcgtgctatcgcggtgcatcctatggactgcgcagtatgccgtaacggtc
gtatcgaaacgatgtatctggactccatcaagttaatgctggaaaaaggtctggtgccggttctgcacggcgacgtcgcaatggat
attgaactgggcacttgtatcctgtccggtgatcaaatcgttccttacctggccaaagaactgggtatctcccgcctggcctgggca
gcgcagaggatggtgtgctggatatggagggcaaacctgtaccggaaatcacccagaaacttcgaagagttccgccactgca
tcggtggttctggttctactgatgtaacggtggcatgctgggcaaagtgctggaacttctggaatgagcaaaaatcttccattacta
gctacatttcaacgctggtaaagcagacaacatctacgcttctgaatggtgagtccatcggcactgcatcagccgggacaag
cgtgtttaagctagttatttaacctaaatgctctaaaccagttatgagctctacaaggaggaaaaaaaacatgattaacactaccagcc
gccgcaaaattgaacacctgaaactctgcgcagaatcccgggttgaagcgcgtcaggtatctgccggcttgaagacgttactctg
atccaccgcgctttaccggagctgaacatggatgaactggacctcagcgttgatttcctgggtaaacgcatcaaagcgccgttcctg
attgcgtctatcacgggtggtcaccagataccatcccggttaacgctgcgctggcagctgctgctgaggagctgggtgttggcatc
ggcgttggctctcagcgcgcggccattgatgatccgagccaggaagacagctccgtgtagtgcgtgatgaagcccagatgcgt
ttgtttatggcaacgtcggcgcagcacagatccgtcagtatggtgttgaaggtgttgaaaaaactgatcgaaatgattgacgcagatg
ccttggcaatccacctgaacttctgcaagaagcggtccaaccggaaggtgacgcgacgcgaccggttgcctggacatgattac
cgaaattgctctcagattaaaactccggtaatcgtgaaagaaacgggtgcaggcattagccgtgaagatgcgattctgttccaga
aagctggcgtgagcgcaatcgacgttggcgccgcggcgcgcacctctgggctggcgtcgaggtctaccgtgctaaagaaagc
cgtgactctgttagcgagcgttaggtgagctgtttgggatttcggcattccgacggtagcttctctgattgaatccgcgtttccttgcc
gctgatcgcaaccggcggtatccgtaacggtctggacattgctaaaagcattgctctcggcgcaagcgctgccagcgccgctctg
ccgttcgttggtccgtcctggagggcaaagaatccgttgtacgtgtgctgagctgcatgctggaagaatttaaagcagcaatgtttt
gtgcggttgcggcaacatcaaaga

Fig. 112C

cctgcacaactctccagtagtggtaactggttggacccgcgaatacctggagcagcgcggtttaacgttaaggacctcicccc
gcgggcaacgctctgtaagcttcaacgcgtctacaaataaaaaaggcacgtcagatgacgtgcctttttttctgtctaga
(SEQ ID NO:102)

Fig. 113A



MCM382 - pTrcKudzuMVK(mazei)
6846 bp

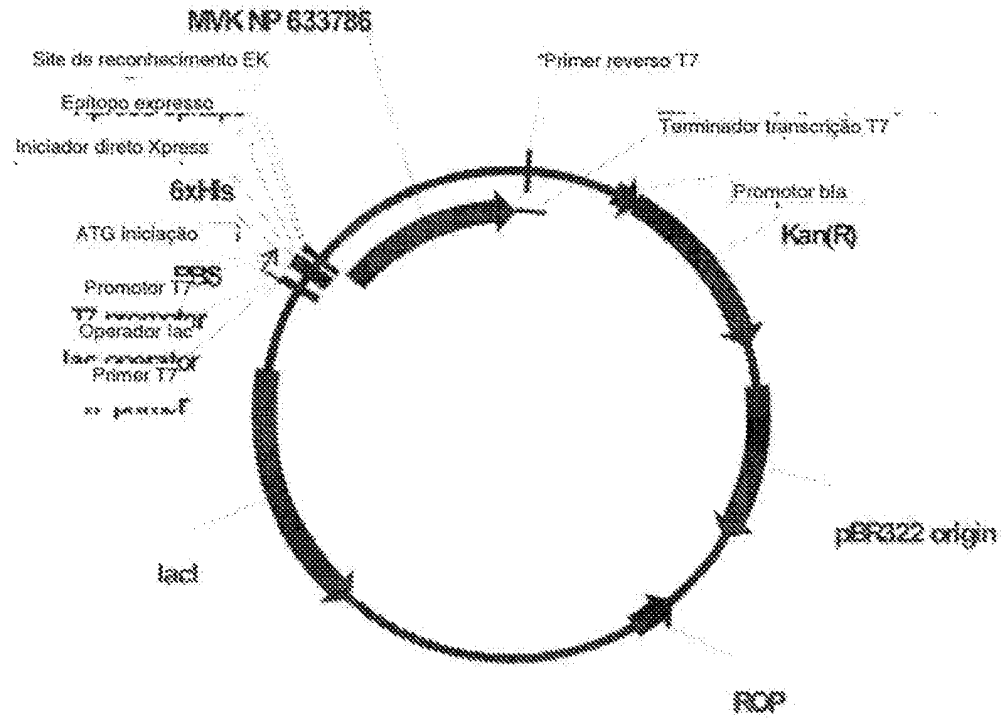
Fig. 113B

gtttgacagcttatcatcgactgcacggtgcaccaatgcttctggcgtcaggcagccatcggaagctgtggtatggctgtgca
ggtcgtaaatcactgcataattcgtgtcgctcaaggcgcactcccgttctggataatgttttttgcgccgacatcataacggttctg
gcaaatattctgaaatgagctgttgacaattaatcatcggctcgtataatgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacaca
ggaaacagcgccgctgagaaaaagcgaagcggcactgctctttaacaatttatcagacaatctgtgtgggcactcgaccg
gaattatcgattaactttattattaaaaattaaagaggtatatattaatgtatcgattaaataaggaggaataaaccatgtgtgcg
acctcttctcaatttactcagattaccgagcataattcccgtcgttccgcaaactatcagccaaacctgtggaatttcgaattcct
gcaatcctggagaacgacctgaaagtggaaaagctggaggagaaagcgaccaaactggaggaagaagttcgctgca
tgatcaaccgtgtagacacccagccgctgtccctgctggagctgatcgacgatgtgcagcgcctgggtctgacctacaaattt
gaaaaagacatcattaaagccctggaaaacatcgtactgctggacgaaaacaaaaagaacaaatctgacctgcacgca
accgctctgtctttccgtctgctgcgtcagcacggtttcgaggtttctcaggatgtttttgagcgtttcaaggataaagaaggtggtt
tcagcggtgaactgaaaggtgacgtccaaggcctgctgagcctgtatgaagcgtcttacctgggtttcgagggtgagaacct
gctggaggaggcgcgtacctttccatcacccacctgaagaacaacctgaaagaaggcattaataccaaggttgcagaac
aagtgagccacgccctggaactgccatatcaccagcgtctgcaccgtctggaggcacgttggttcctggataaatacgaac
cgaaagaaccgcatcaccagctgctgctggagctggcgaagctggattttaacatggtacagaccctgcaccagaaaga
gctgcaagatctgtcccgctggtggaccgagatgggcctggctagcaaactggattttgtacgcgaccgcctgatggaagttt
atttctgggcactgggtatggcgccagacccgcagtttggtgaatgtcgcaaagctgttactaaaatgtttggtctggtgacgat
catcgatgacgtgtatgacgtttatggcactctggacgaactgcaactgttcaccgatgctgtagagcgctgggacgttaacg
ctattaacaccctgccggactatatgaaactgtgtttcctggcactgtacaacaccgttaacgacacgtcctattctattctgaaa
gagaaaggtcataacaacctgtcctatctgacgaaaagctggcgtgaactgtgcaaagcctttctgcaagaggcgaaatgg
tccaacaacaaaattatcccggctttctccaagtacctggaaaacgccagcgtttcctcctccggtgtagcgctgctggcgcc
gtcttactttccgtatgccagcagcaggaagacatctccgaccacgcgctgcgttccctgaccgacttccatggtctggtgcgt
tctagctgcgttatcttccgcctgtgcaacgatctggccacctctgcggcggagctggaacgtggcgagactaccaattctatc
attagctacatgcacgaaaacgatggtaccagcgaggaacaggcccgcgaagaactgcgtaaactgatcgacgccgaa
tggaaaaagatgaatcgtgaacgcgttagcgactccaccctgctgcctaaagcgttcatggaaatcgcagttaacatggca
cgtgtttcccactgcacctaccagtatggcgatggtctgggtcgcccagactacgcgactgaaaaccgcatcaaactgctgct
gattgaccctttcccgattaaccagctgatgtatgtctaactgcataaaggaggtaaaaaaacatggtatcctgttctgcgccg
ggtaagatttacctgttcggtgaacacgccgtagtttatggcgaaactgcaattgcgtgtgcggtggaactgcgtacccgtgttc
gcgcggaactcaatgactctatcactattcagagccagatcggccgcaccggtctggatttcgaaaagcacccttatgtgtct
gcggtaattgagaaaatgcgcaaatctattcctattaacggtgttttcttgaccgtcgattccgacatcccggtgggctccggtct
gggtagcagcgcagccgttactatcgcgtctattggtgcgctgaacgagctgttcggctttggcctcagcctgcaagaaatcg
ctaaactgggccacgaaatcgaaattaaagtacagggtgccgcgtccccaaccgatacgtatgtttctaccttcggcggcgt
ggttaccatcccggaacgtcgcaaactgaaaactccggactgcggcattgtgattggcgataccggcgttttctcctccacca
aagagttagtagctaacgtacgtcagctgcgcgaaagctacccggatttgatcgaaccgctgatgacctctattggcaaaat
ctctcgtatcggcgaacaactggttctgtctggcgactacgcatccatcggccgcctgatgaacgtcaaccagggtctcctgg
acgccctgggcgttaacatcttagaactgagccagctgatctattccgctcgtgcggcaggtgcgtttggcgctaaaatcacg
ggcgctggcggcggtggctgtatggttgcgctgaccgctccggaaaaatgcaaccaagtggcagaagcggtagcaggcg
ctggcggtaaagtgactatcactaaaccgaccgagcaaggtctgaaagtagattaaagtctagttaaagtttaaacggtctcc
agcttggctgttttggcggatgagagaagattttcagcctgatacagattaaatcagaacgcagaagcggtctgataaaaca
gaatttgcctggcggcagtagcgcggtggtcccacctgaccccatgccgaactcagaagtgaaacgccgtagcgccgatg
gtagtgtggggtctccccatgcgagagtagggaactgccaggcatcaaataaaacgaaaggctcagtcgaaagactggg
cctttcgttttatctgttgtttgtcggtgaacgctctcctgagtaggacaaatccgccgggagcggatttgaacgttgcgaagcaa
cggcccggagggtggcgggcaggacgcccgccataaactgccaggcatcaaattaagcagaaggccatcctgacggat
ggcctttttgcgtttctacaaactcttttgtttatttttctaaatacattcaaatatgtatccgcttaaccggaattgccagctggggcg
ccctctggtaaggttgggaagccctgcaaagtaaactggatggctttctcgccgccaaggatctgatggcgcaggggatca
agctctgatcaagagacaggatgaggatcgtttcgcatgattgaacaagatggattgcacgcaggttctccggccgcttgggt
ggagaggctattcggctatgactgggcacaa

Fig. 113C

cagacaatcggctgctctgatgccgccgtgttccggctgtcagcgcaggggcgcccggttcttttgtcaagaccgacctgtccgg
tgccctgaatgaactgcaagacgaggcagcgcggctatcgtggctggccacgacgggcgttccttgcgcagctgtgctcgacgt
tgtcactgaagcgggaagggactggctgctattgggcgaagtgccggggcaggatctcctgtcatctcaccttgctcctgccgag
aaagtatccatcatggctgatgcaatgcggcggctgcatacgcttgatccggctacctgcccattcgaccaccaagcgaaacat
cgcatcgagcgagcacgtactcggatggaagccggtcttgtcgatcaggatgatctggacgaagagcatcaggggctcgcgc
cagccgaactgttcgccaggctcaaggcgagcatgcccgacggcgaggatctcgtcgtgacccatggcgatgcctgcttgccg
aatatcatggtggaaaatggccgcttttctggattcatcgactgtggccggctgggtgtggcggaccgctatcaggacatagcgtt
ggctacccgtgatattgctgaagagcttggcggcgaatgggctgaccgcttcctcgtgctttacggtatcgccgctcccgatttcgca
gcgcatcgccttctatcgccttcttgacgagttcttctgacgcatgaccaaaatcccttaacgtgagttttcgttccactgagcgtcag
accccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatcctttttttctgcgcgtaatctgctgcttgcaaacaaaaaaaccaccgctac
cagcggtggtttgtttgccggatcaagagctaccaactctttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaaatact
gtccttctagtgtagccgtagttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgctctgctaatcctgttaccag
tggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttggactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggtcgggct
gaacgggggttcgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgag
aaagcgccacgcttcccgaagggagaaaggcggacaggtatccggtaagcggcagggtcggaacaggagagcgcacga
gggagcttccagggggaaacgcctggtatctttatagtcctgtcgggtttcgccacctctgacttgagcgtcgatttttgtgatgctcgt
caggggggcggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggcctttttacggttcctggccttttgctggccttttgctcacatgttctt
tcctgcgttatcccctgattctgtggataaccgtattaccgcctttgagtgagctgataccgctcgccgcagccgaacgaccgagc
gcagcgagtcagtgagcgaggaagcggaagagcgcctgatgcggtatttctccttacgcatctgtgcggtatttcacaccgcat
atggtgcactctcagtacaatctgctctgatgccgcatagttaagccagtatacactccgctatcgctacgtgactgggtcatggct
gcgccccgacacccgccaacacccgctgacgcgccctgacgggcttgtctgctcccggcatccgcttacagacaagctgtgac
cgtctccgggagctgcatgtgtcagaggttttcaccgtcatcaccgaaacgcgcgaggcagcagatcaattcgcgcgcgaagg
cgaagcggcatgcatttacgttgacaccatcgaatggtgcaaaacctttcgcggtatggcatgatagcgcccggaagagagtca
attcagggtggtgaatgtgaaaccagtaacgttatacgatgtcgcagagtatgccggtgtctcttatcagaccgtttcccgcgtggt
gaaccaggccagccacgtttctgcgaaaacgcgggaaaaagtggaagcggcgatggcggagctgaattacattcccaaccg
cgtggcacaacaactggcgggcaaacagtcgttgctgattggcgttgccacctccagtctggccctgcacgcgccgtcgcaaat
tgtcgcggcgattaaatctcgcgccgatcaactgggtgccagcgtggtggtgtcgatggtagaacgaagcggcgtcgaagcctg
taaagcggcgggtgcacaatcttctcgcgcaacgcgtcagtgggctgatcattaactatccgctggatgaccaggatgccattgct
gtggaagctgcctgcactaatgttccggcgttatttcttgatgtctctgaccagacacccatcaacagtattattttctcccatgaaga
cggtacgcgactgggcgtggagcatctggtcgcattgggtcaccagcaaatcgcgctgttagcgggcccattaagttctgtctcg
gcgcgtctgcgtctggctggctggcataaatatctcactcgcaatcaaattcagccgatagcggaacgggaaggcgactggagt
gccatgtccggttttcaacaaaccatgcaaatgctgaatgagggcatcgttcccactgcgatgctggttgccaacgatcagatgg
cgctgggcgcaatgcgcgccattaccgagtccgggctgcgcgttggtgcggatatctcggtagtgggatacgacgataccgaa
gacagctcatgttatatcccgccgtcaaccaccatcaaacaggattttcgcctgctggggcaaaccagcgtggaccgcttgctgc
aactctctcagggccaggcggtgaagggcaatcagctgttgcccgtctcactggtgaaaagaaaaaccaccctggcgcccaat
acgcaaaccgcctctccccgcgcgttggccgattcattaatgcagctggcacgacaggtttcccgactggaaagcgggcagtg
agcgcaacgcaattaatgtgagttagcgcgaattgatctg
(SEQ ID NO:103)

Fig. 114A



MCM376 - MVK from M. mazei archeal Lowerin pET200D

Fig. 114B

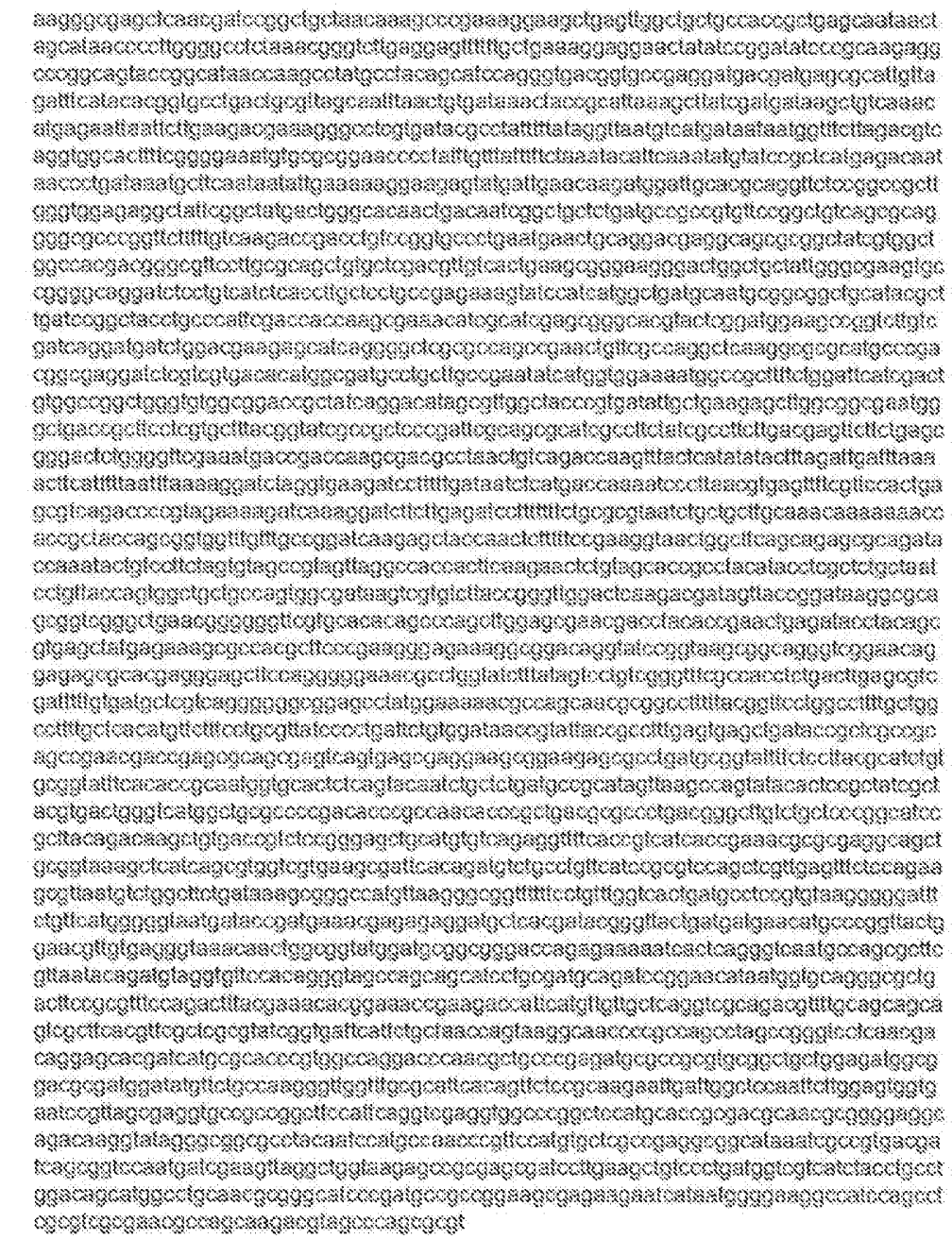


Fig. 114C

cggccgccatgccggcgataatggcctgcttctcgccgaaacgtttggtggcgggaccagtgacgaaggctt
gagcgagggcgtgcaagattccgaataccgcaagcgacaggccgatcatcgtcgcgctccagcgaaagc
ggtcctcgccgaaaatgacccagagcgctgccggcaccgtcctacgagttgcatgataaagaagacagtc
ataagtgcggcgacgatagtcatgccccgcgcccaccggaaggagctgactgggttgaaggctctcaaggg
catcggtcgacgatccggttgcctaatgagtgagctaacttacattaattgcgttgcgctcactgcccgctttccag
tcgggaaacctgtcgtgccagctgcattaatgaatcggccaacgcgcggggagaggcggtttgcgtattggg
cgccagggtggtttttcttttcaccagtgagacgggcaacagctgattgcccttcaccgcctggccctgagaga
gttgcagcaagcggtccacgctggtttgccccagcaggcgaaaatcctgtttgatggtggttaacggcgggat
ataacatgagctgtcttcggtatcgtcgtatcccactaccgagatatccgcaccaacgcgcagcccggactcg
gtaatggcgcgcattgcgcccagcgccatctgatcgttggcaaccagcatcgcagtgggaacgatgccctcat
tcagcatttgcatggtttgttgaaaaccggacatggcactccagtcgccttcccgttccgctatcggctgaatttga
ttgcgagtgagatatttatgccagccagccagacgcagacgccgccgagacagaacttaatgggcccgctaa
cagcgcgatttgctggtgacccaatgcgaccagatgctccacgcccagtcgcgtaccgtcttcatgggagaaa
ataatactgttgatgggtgtctggtcagagacatcaagaaataacgccggaacattagtgcaggcagcttcca
cagcaatggcatcctggtcatccagcggatagttaatgatcagcccactgacgcgttgcgcgagaagattgtg
caccgccgctttacaggcttcgacgccgcttcgttctaccatcgacaccaccacgctggcacccagttgatcgg
cgcgagatttaatcgccgcgacaatttgcgacggcgcgtgcagggccagactggaggtggcaacgccaatc
agcaacgactgtttgcccgccagttgttgtgccacgcggttgggaatgtaattcagctccgccatcgccgcttcc
actttttcccgcgttttcgcagaaacgtggctggcctggttcaccacgcgggaaacggtctgataagagacacc
ggcatactctgcgacatcgtataacgttactggtttcacattcaccaccctgaattgactctcttccgggcgctatc
atgccataccgcgaaaggttttgcgccattcgatggtgtccgggatctcgacgctctcccttatgcgactcctgca
ttaggaagcagcccagtagtaggttgaggccgttgagcaccgccgccgcaaggaatggtgcatgcaaggaa
gatggcgcccaacagtcccccggccacggggcctgccaccatacccacgccgaaacaagcgctcatgag
cccgaagtggcgagcccgatcttccccatcggtgatgtcggcgatataggcgccagcaaccgcacctgtggc
gccggtgatgccggccacgatgcgtccggcgtagaggatcgagatctcgatcccgcgaaattaatacgactc
actatagggaattgtgagcggataacaatttcccctctagaaataattttgtttaactttaagaaggagatataca
tatgcggggttctcatcatcatcatcatcatggtatggctagcatgactgggtggacagcaaatgggtcgggatct
gtacgacgatgacgataaggatcatccttcaccatggtatcctgttctgccgcgggtaagatttaccttgttcggt
gaacacgccgtagtttatggcgaaactgcaattgcgtgtgcggtggaactgcgtaccgtgttcgccgcggaact
caatgactctatcactattcagagccagatcggccgcaccggtctggatttcgaaaagcaccccttatgtgtctgc
ggtaattgagaaaatgcgcaaatctattcctattaacggtgtttcttgaccgtcgattccgacatcccggtgggct
ccggtctgggtagcagcgcagccgttactatcgcgtctatggtgcgctgaacgagctgttcggctttggcctca
gcctgcaagaaatcgctaaactgggccacgaaatcgaaattaaagtacagggtgccgcgtcccccaaccgat
acgtatgtttctaccttcggcggcgtggttaccatccggaacgtcgcaaactgaaaactccggactgcggcat
tgtgattggcgataccggcgttttctcctccaccaaagagttagtagctaacgtacgtcagctgcgcgaaagcta
cccggatttgatcgaaccgctgatgacctctattggcaaaatctctgtatcggcgaacaactggttctgtctggc
gactacgcatccatcggccgcctgatgaacgtcaaccagggtctcctggacgccctgggcgttaacatcttag
aactgagccagctgatctattccgctcgtgcggcaggtgcgtttggcgctaaaatcacgggcgctggcggcgg
tggctgtatggttgcgctgaccgctccggaaaaatgcaaccaagtggcagaagcggtagcaggcgctggcg
gtaaagtgactatcactaaaccgaccgagcaaggtctgaaagtagattaa

(SEQ ID NO:108)

Fig. 115

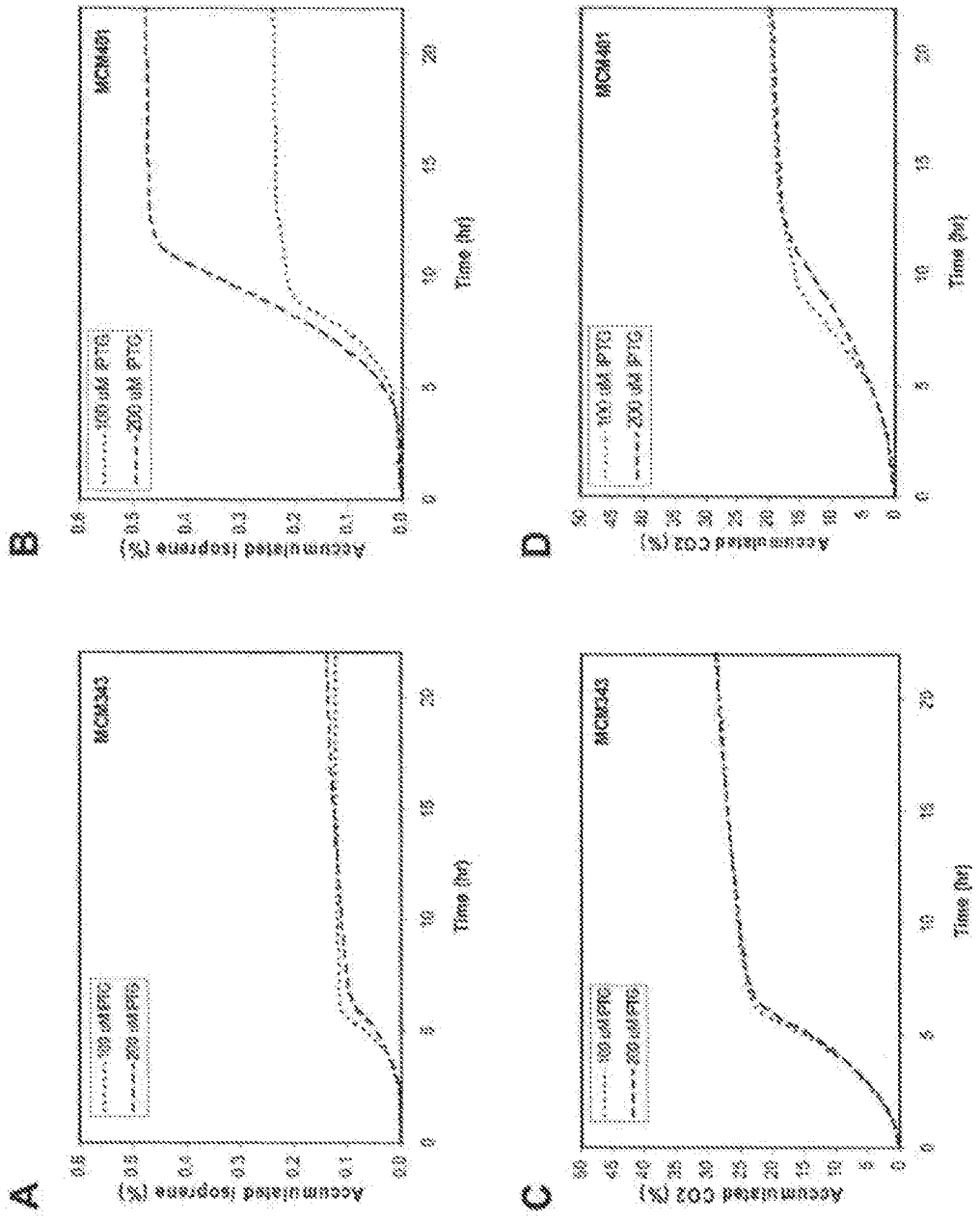

A
MCM343
100 uM PTC
200 uM PTC
Accumulated Isoprene (%)
Time (hr)
B
MCM401
100 uM PTC
200 uM PTC
Accumulated Isoprene (%)
Time (hr)
C
MCM343
100 uM PTC
200 uM PTC
Accumulated CO2 (%)
Time (hr)
D
MCM401
100 uM PTC
200 uM PTC
Accumulated CO2 (%)
Time (hr)

Fig. 116

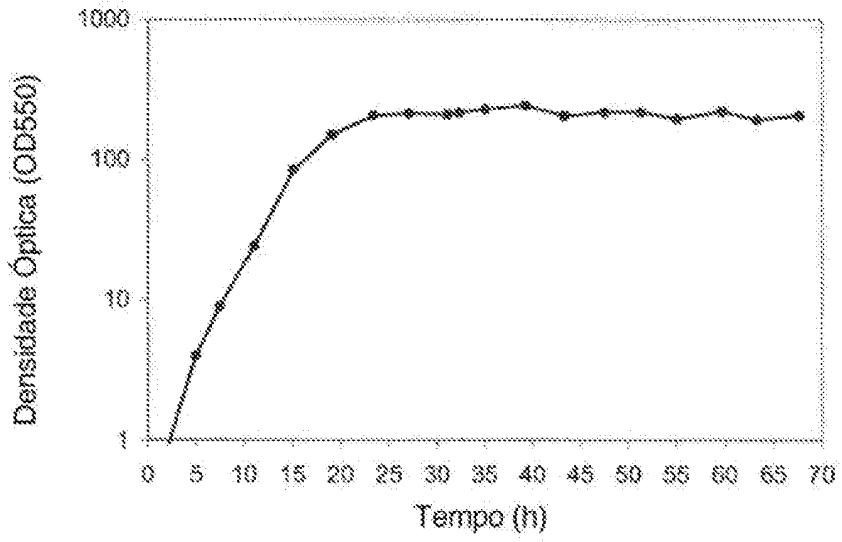

1000
100
10
1
Densidade Óptica (OD550)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
70
Tempo (h)

Fig. 117

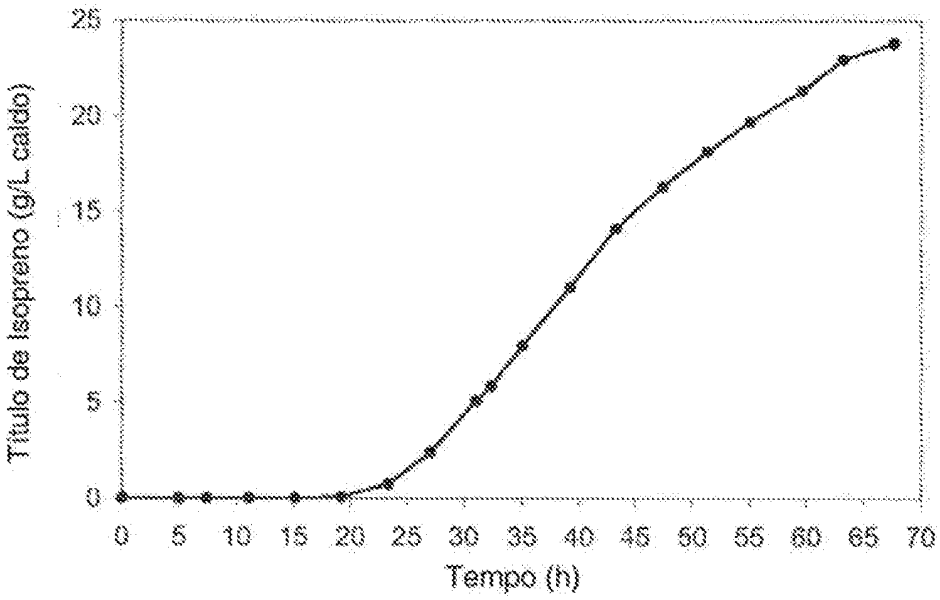

Título de Isopreno (g/L caldo)
25
20
15
10
5
0
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70
Tempo (h)

Fig. 118

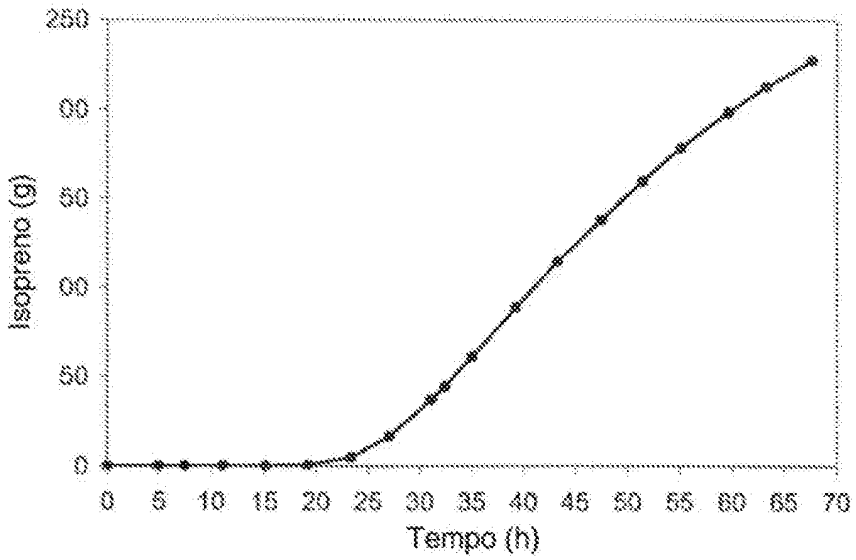

250
00
50
00
50
0
Isoprenol (g)
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70
Tempo (h)

Fig. 119

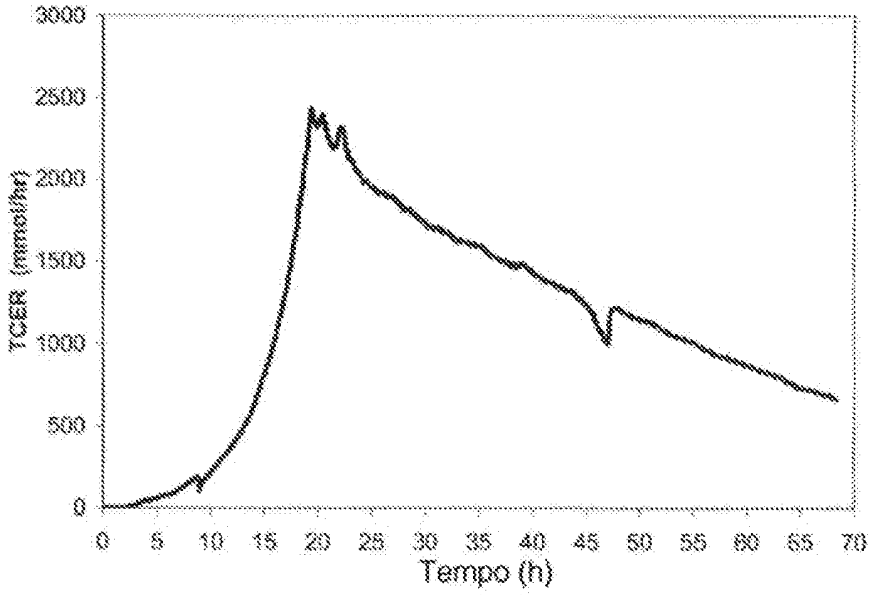

3000
2500
2000
1500
1000
500
0
TCER (mmol/hr)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
70
Tempo (h)

Fig. 120

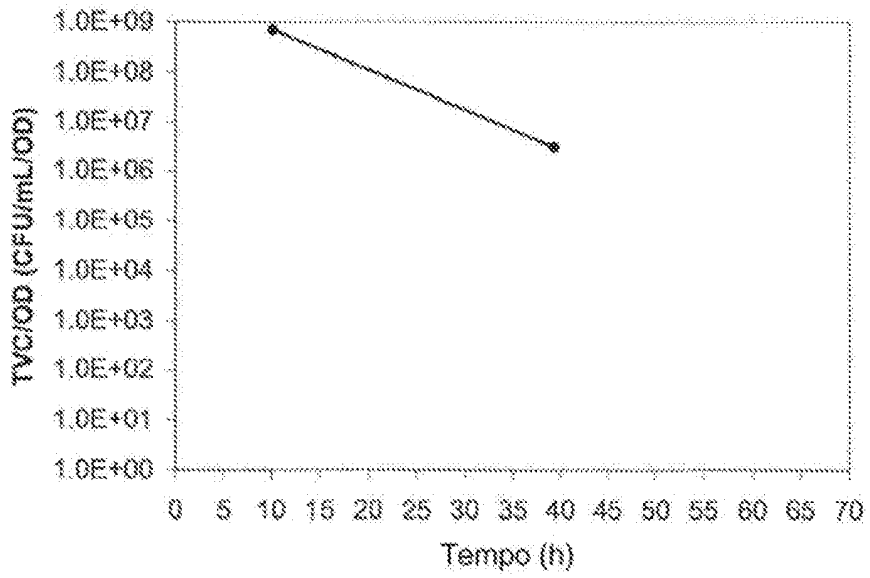

1.0E+09
1.0E+08
1.0E+07
1.0E+06
1.0E+05
1.0E+04
1.0E+03
1.0E+02
1.0E+01
1.0E+00
TVC/OD (CFU/mL/OD)
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70
Tempo (h)

Fig. 121

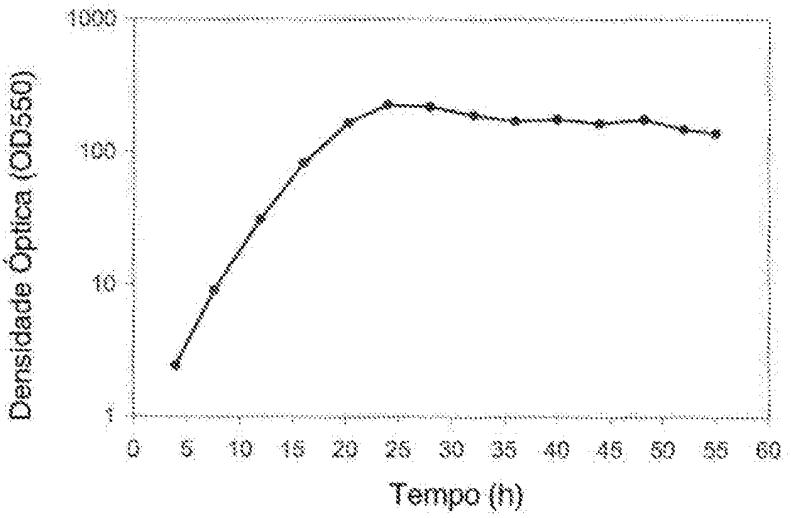

Densidade Óptica (OD550)
1000
100
10
1
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
Tempo (h)

Fig. 122

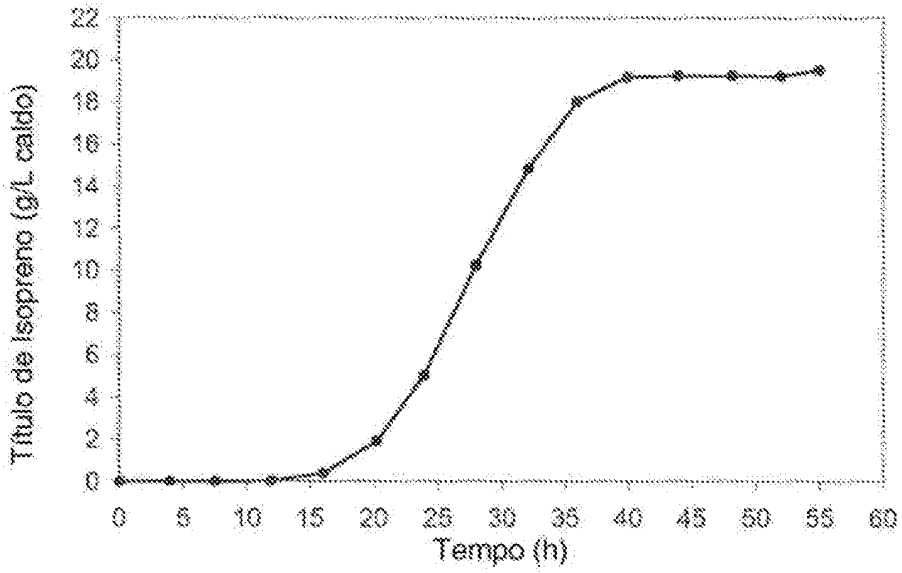

Título de Isopreno (g/L caldo)
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
Tempo (h)

Fig. 123

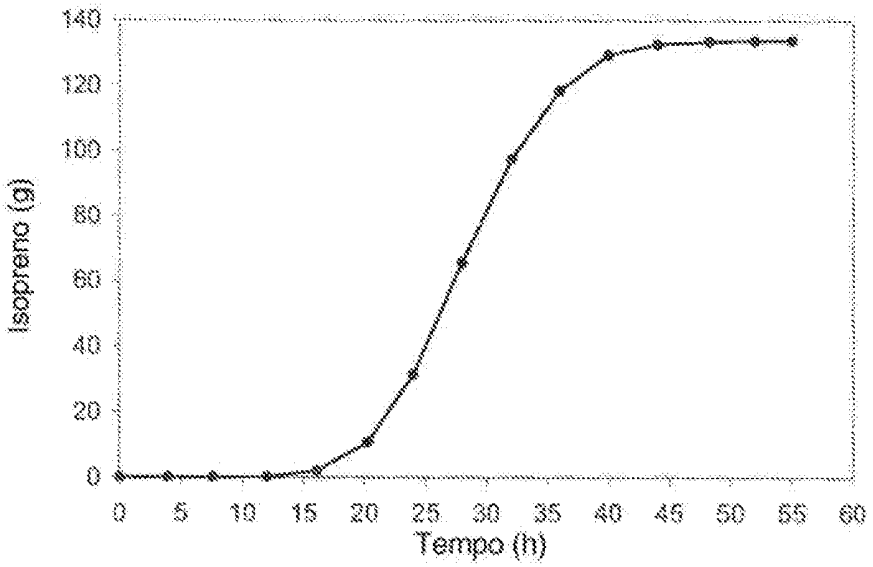

Isopreno (g)
140
120
100
80
60
40
20
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
Tempo (h)

Fig. 124

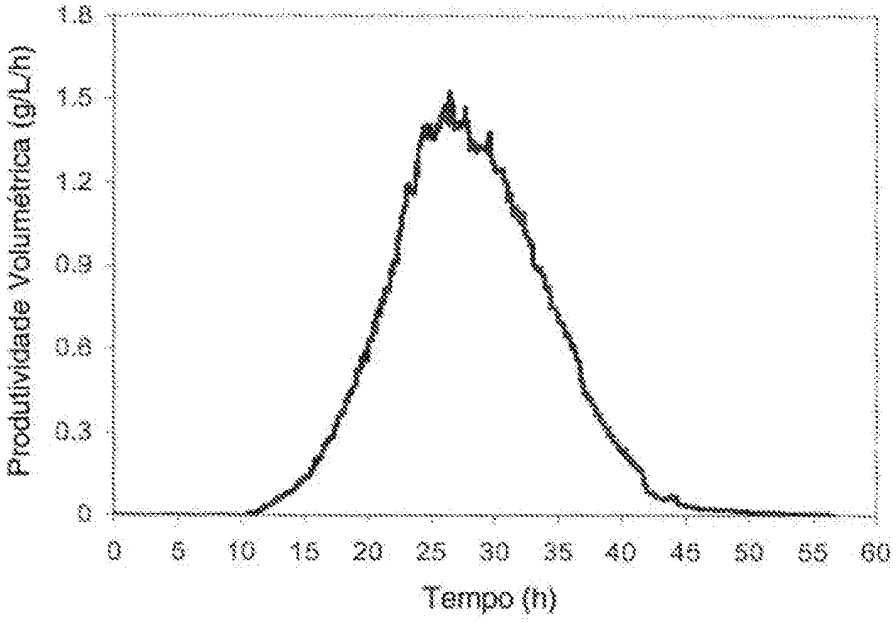

Produtividade Volumétrica (g/L/h)
1.8
1.5
1.2
0.9
0.6
0.3
0
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60
Tempo (h)

Fig. 125

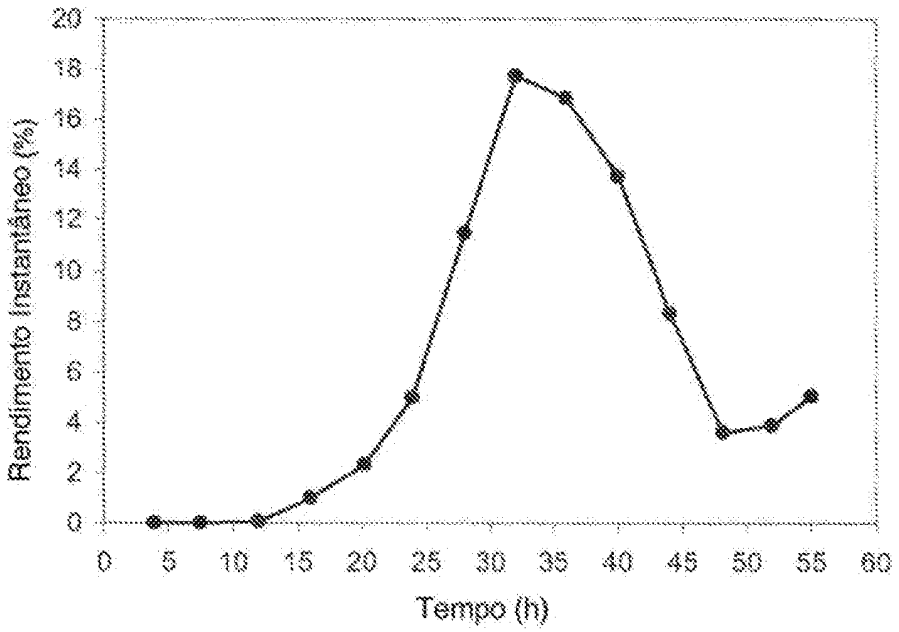

Rendimento instantâneo (%)
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
Tempo (h)

Fig. 126

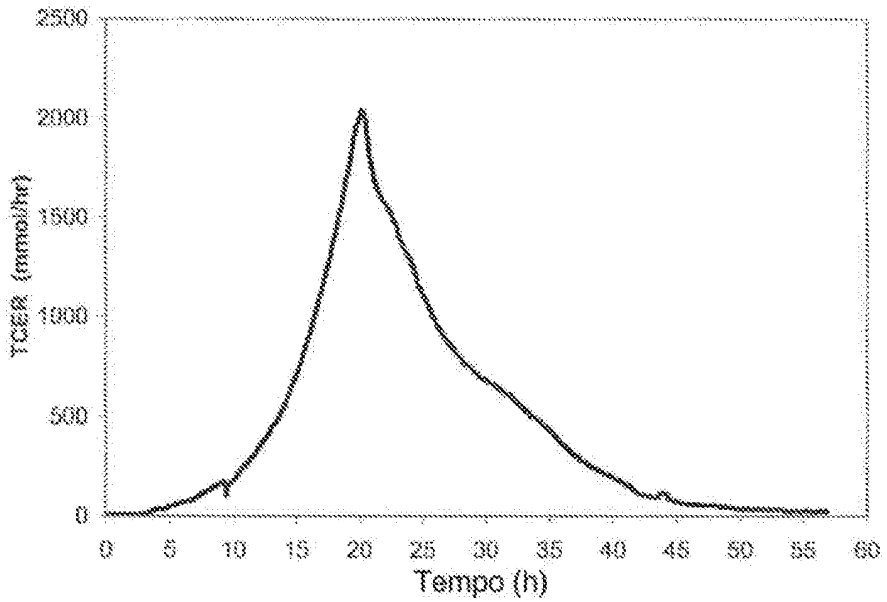

2500
2000
1500
1000
500
0
TCE/A (mmol/hr)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
Tempo (h)

Fig. 127

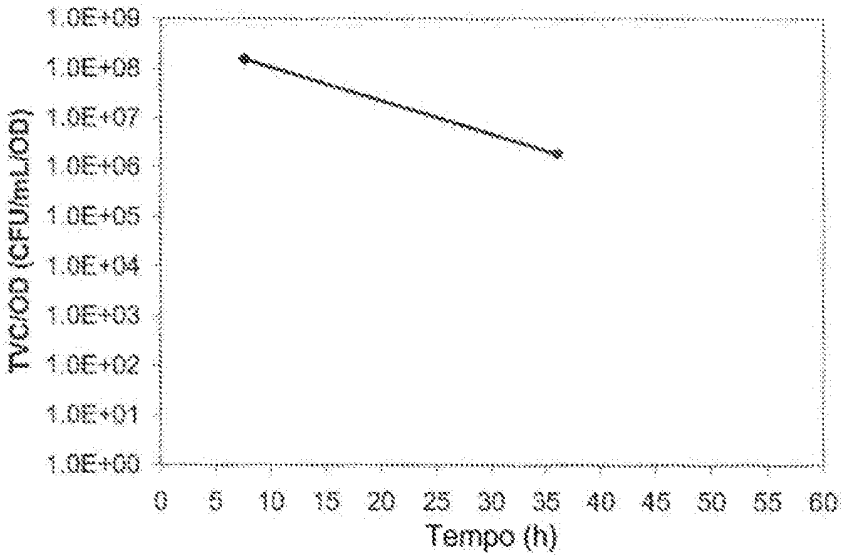

1.0E+09
1.0E+08
1.0E+07
1.0E+06
1.0E+05
1.0E+04
1.0E+03
1.0E+02
1.0E+01
1.0E+00
TVC/OD (CFU/mL/OD)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
Tempo (h)

Fig. 128

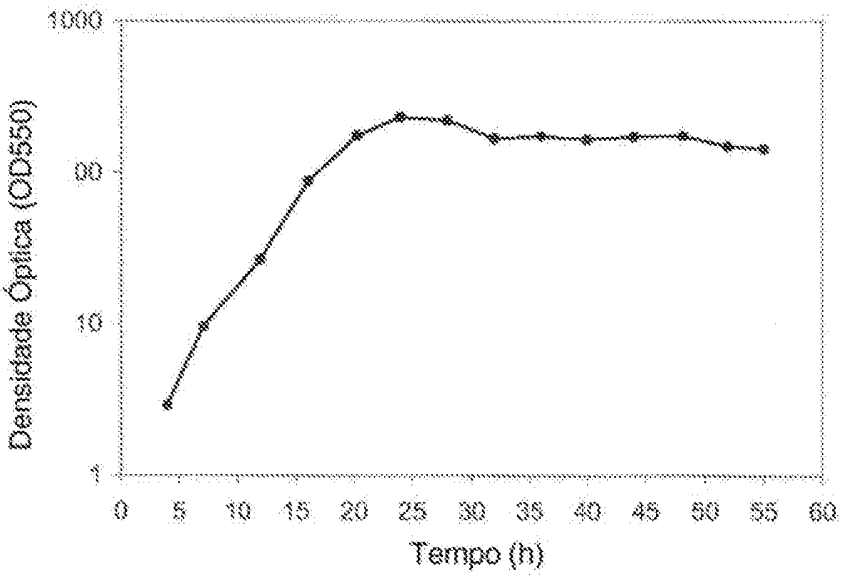

1000
00
10
1
Densidade Óptica (OD550)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
Tempo (h)

Fig. 129

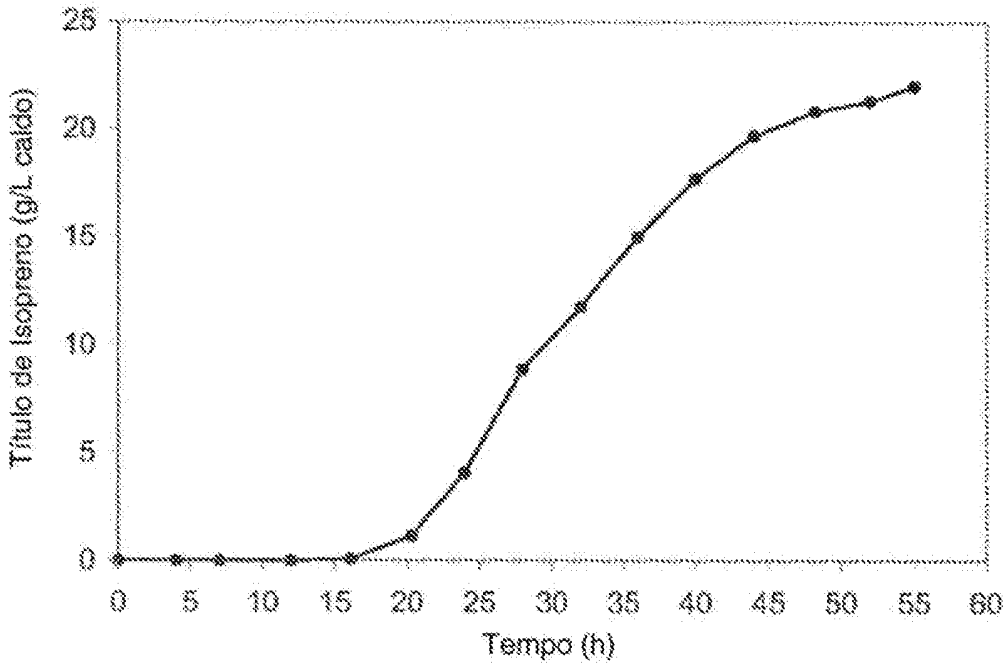

Título de Isopreno (g/L caldo)
25
20
15
10
5
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
Tempo (h)

Fig. 130

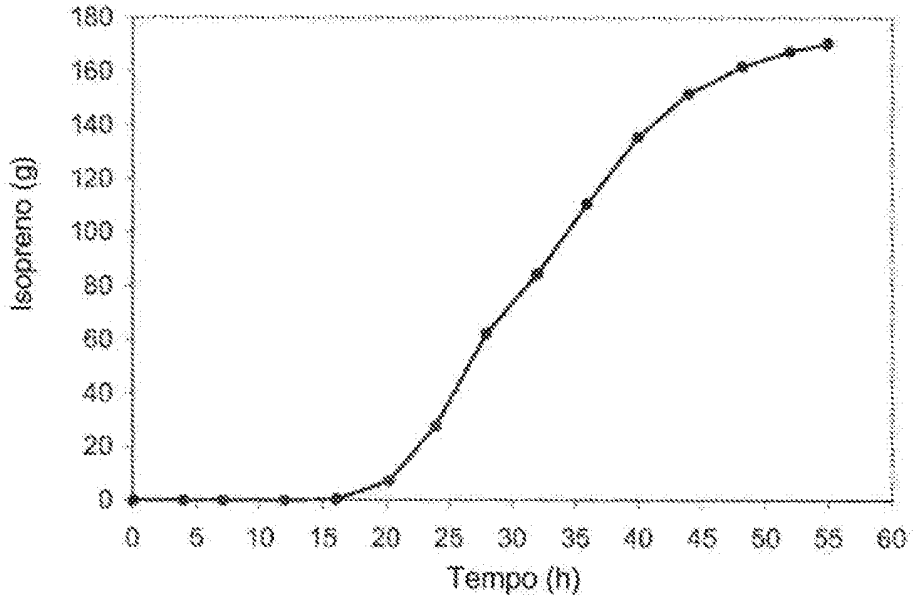

180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
Isopreno (g)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
Tempo (h)

Fig. 131

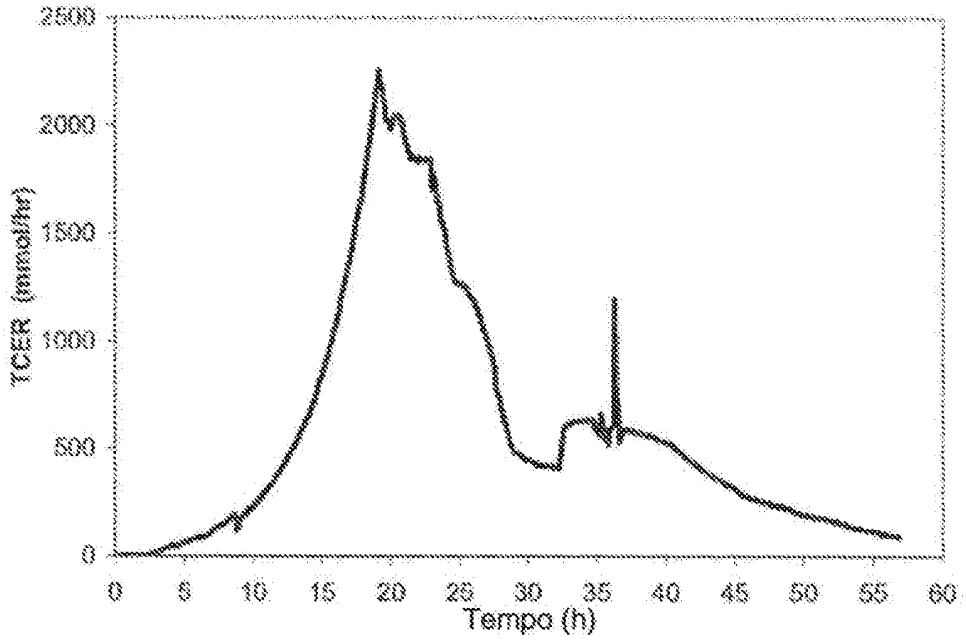

2500
2000
1500
1000
500
0
TCER (mmol/hr)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
Tempo (h)

Fig. 132

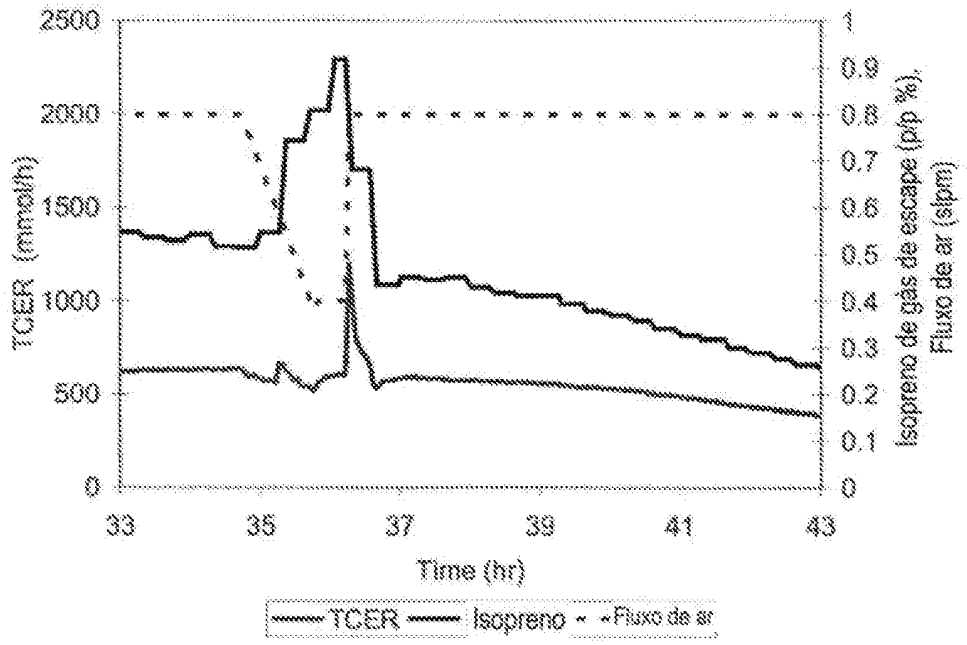

2500
2000
1500
1000
500
0
TCER (mmol/h)
1
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
Isopreno de gás de escape (p/p %), Fluxo de ar (slpm)
33
35
37
39
41
43
Time (hr)
TCER
Isopreno
Fluxo de ar

Fig. 133

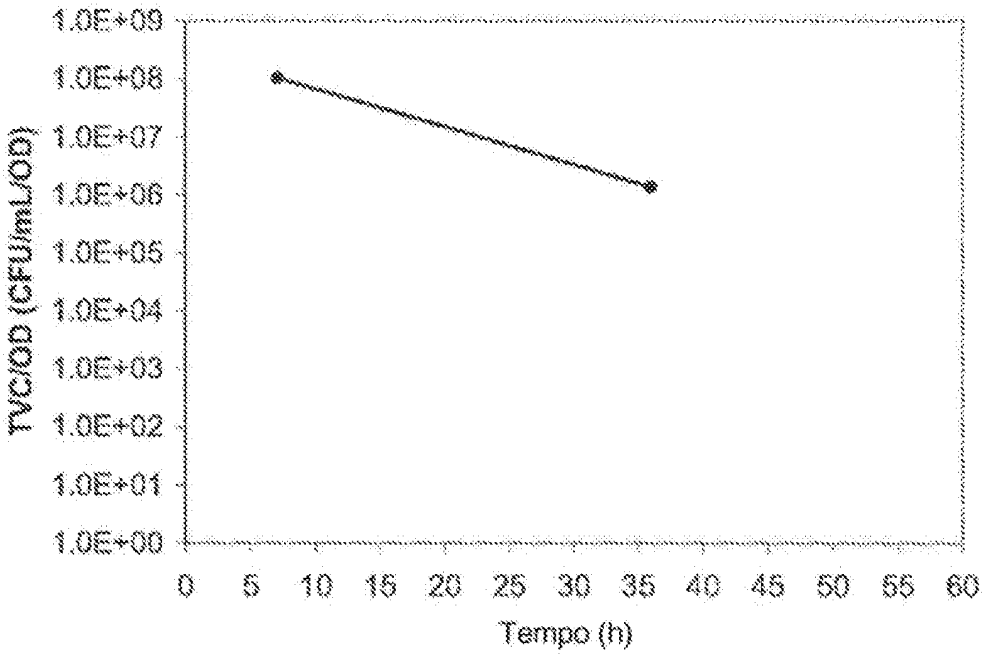

1.0E+09
1.0E+08
1.0E+07
1.0E+06
1.0E+05
1.0E+04
1.0E+03
1.0E+02
1.0E+01
1.0E+00
TVC/OD (CFU/mL/OD)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
Tempo (h)

Fig. 134

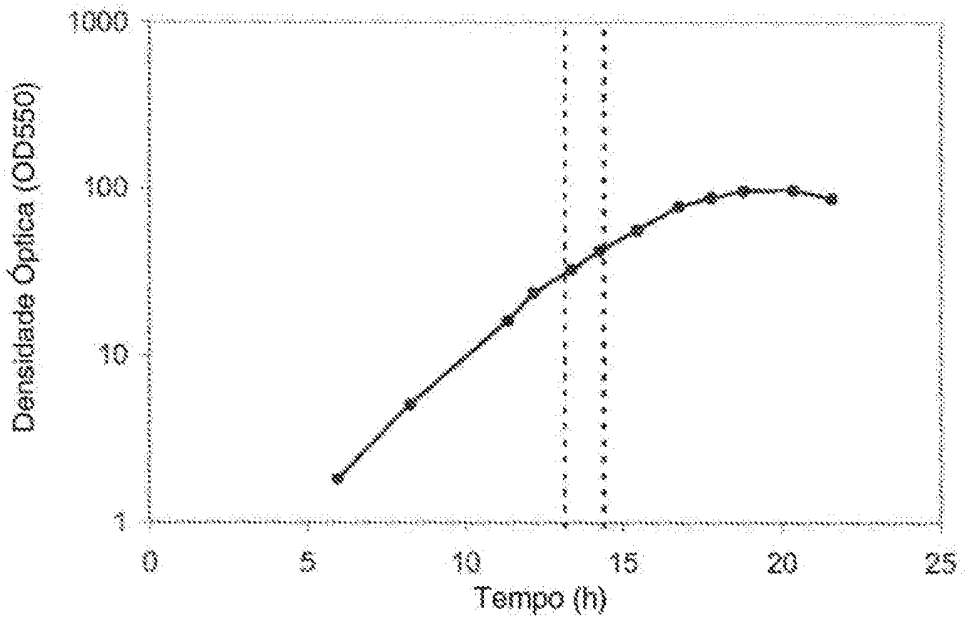


Fig. 135

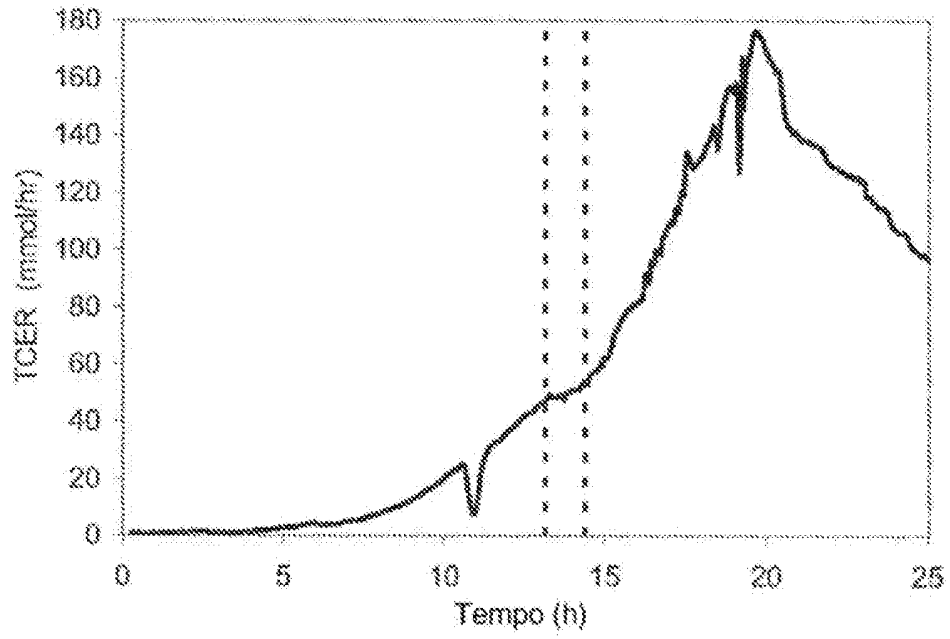

180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
TCER (mmol/hr)
0
5
10
15
20
25
Tempo (h)

Fig. 136

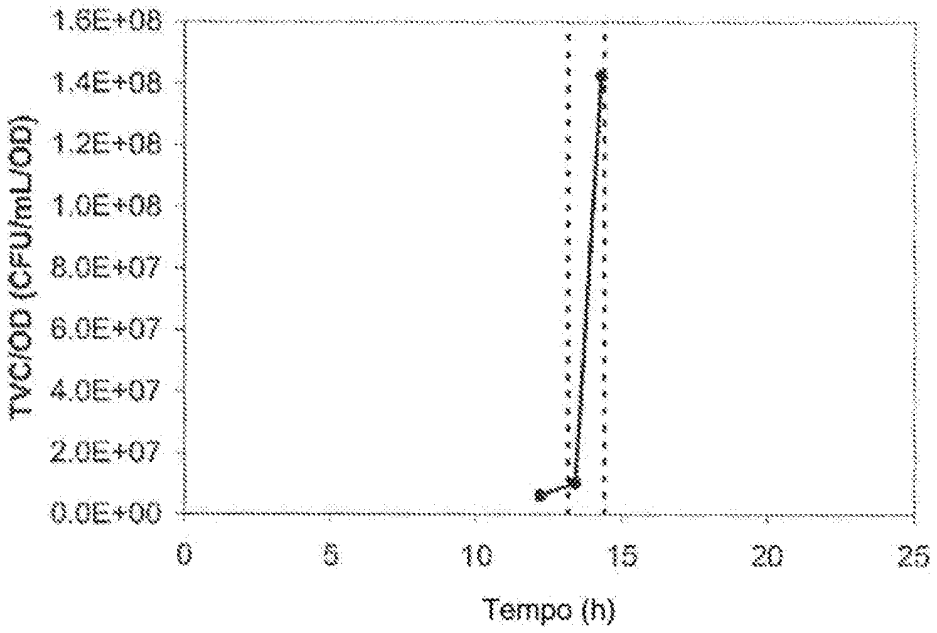

1.6E+08
1.4E+08
1.2E+08
1.0E+08
8.0E+07
6.0E+07
4.0E+07
2.0E+07
0.0E+00
TVC/OD (CFU/mL/OD)
0
5
10
15
20
25
Tempo (h)

Fig. 137A

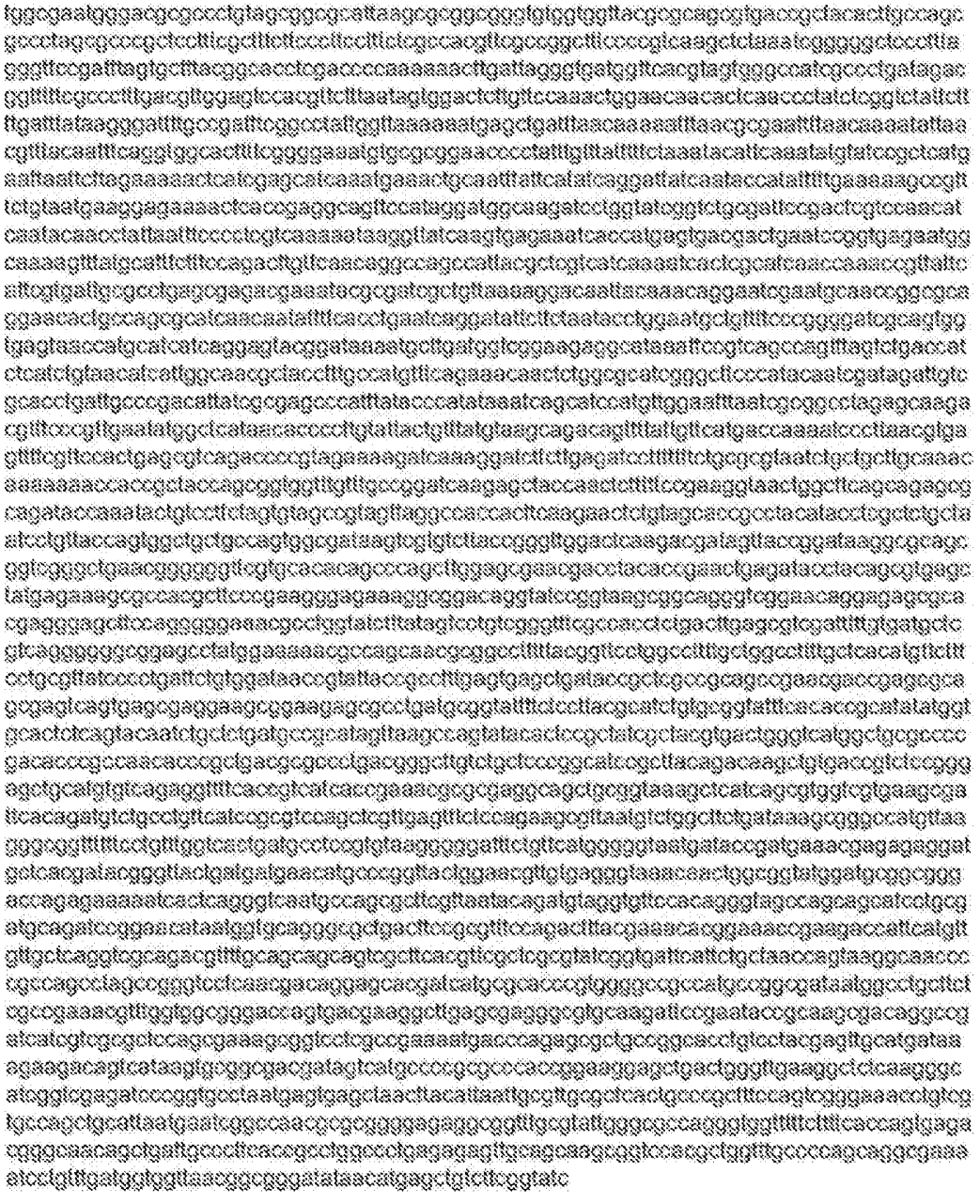


Fig. 137B

gtcgtatcccactaccgagatatccgcaccaaacgcgcagcccggactcggtaatggcgcgcattgcgcccagcgccatct
gatcgttggcaaccagcatcgcagtgggaacgatgccctcattcagcatttgcatggtttgttgaaaaccggacatggcactc
cagtcgccttcccgttccgctatcggctgaatttgattgcgagtgagatatttatgccagccagccagacgcagacgcgccga
gacagaacttaatgggcccgctaacagcgcgatttgctgggtgacccaatgcgaccagatgctccacgcccagtcgcgtacc
gtcttcatgggagaaaataatactgttgatgggtgtctggtcagagacatcaagaaataacgccggaacattagtgcaggca
gcttccacagcaatggcatcctggtcatccagcggatagttaatgatcagcccactgacgcgttgcgcgagaagattgtgca
ccgccgctttacaggcttcgacgccgcttcgttctaccatcgacaccaccacgctggcaccccagttgatcggcgcgagattta
atcgccgcgacaatttgcgacggcgcgtgcagggccagactggaggtggcaacgccaatcagcaacgactgtttgcccg
ccagttgttgtgccacgcggttgggaatgtaattcagctccgccatcgccgcttccacttttccgcgttttcgcagaaacgtgg
ctggcctggttcaccacgcgggaaacggtctgataagagacaccggcatactctgcgacatcgtataacgttactggtttcac
attcaccaccctgaattgactctcttccgggcgctatcatgccatacccgcgaaaggttttgcgccattcgatggtgtccgggatc
tcgacgctctcccttatgcgactcctgcattaggaagcagcccagtagtaggttgaggccgttgagcaccgccgccgcaag
gaatggtgcatgcaaggagatggcgcccaacagtcccccggccacggggcctgccaccatacccacgccgaaacaag
cgctcatgagcccgaagtggcgagcccgatcttccccatcggtgatgtcggcgatataggcgccagcaaccgcacctgtgg
cgccggtgatgccggccacgatgcgtccggcgtagaggatcgagatctcgatcccgcgaaattaatacgactcactatagg
ggaattgtgagcggataacaatttcccctctagaaataattttgtttaactttaagaaggagatatacatatgcgttgtagcgtgtc
cacgaaaatgtgtctttcaccgaaactgaaacgaagctcgtcgttctgcgaactacgaacctaacagctgggactatgatt
acctgctgtcctccgacacggacgagtccatcgaagtatacaaagacaaagcgaaaaagctggaagccgaagttcgtcg
cgagattaataacgaaaaagcagaatttctgaccctgctggaactgattgacaacgtccagcgcctgggcctgggttaccgt
ttcgagtctgatatccgtgggtgcgctggatcgctcgtttcctcggcggcttcgatgcggtaaccaagacttccctgcacggta
cggcactgtctttccgtctgctgcgtcaacacggtttgaggtttctcaggaagcgttcagcggcttcaaagaccaaaacggca
acttcctggagaaacctgaaggaagatatcaaagctatcctgagcctgtacgaggccagcttcctggctctggaaggcgaaaa
acatcctggacgaggcgaaggtttttcgcaatctctcatctgaaagaactgtctgaagaaaagatcggtaaagagctggcag
aacaggtgaaccatgcactggaactgccactgcatcgccgtactcagcgtctggaagcagtatggtctatcgaggcctacc
gtaaaaaggaggacgcgaatcaggttctgctggagctggcaattctggattacaacatgatccagtctgtataccagcgtgat
ctgcgtgaaacgtccgttggtggcgtcgtgtgggtctggcgaccaaactgcacttttgctcgtgaccgcctgattgagagcttct
actgggccgtgggtgtagcattcgaaccgcaatactccgactgccgtaactccgtcgcaaaaatgttttctttcgtaaccattat
cgacgatatctacgatgtatacggcaccctggacgaactggagctgtttactgatgcagttgagcgttgggacgtaaacgcc
atcaacgacctgccggattacatgaaactgtgctttctggctctgtataacactattaacgaaatgcctacgacaacctgaaaa
gataaaggtgagaacatcctgccgtatctgaccaaagcctgggctgaccgtgcaacgctttctgcaagaagccaagtgg
ctgtacaacaaatctactccgacctttgacgactacttcggcaacgcatggaaatcctcttctggccgctgcaactggtgttcg
ctttacttcgctgtccgtgcagaacattaaaaaggaagagatcgaaaaacctgcaaaaataccatgacaccatctctgtccttcc
catatcttccgtctgtgcaatgacctggctagcgcgtctgcggaaattgcgcgtggtgaaaccgcaaatagcgtttcttgttaca
tgcgcactaaaggtatctccgaagaactggctaccgaaagcgtgatgaatctgatcgatgaaacctggaaaaagatgaaac
aaggaaaaactgggtggtagcctgttcgcgaaaccgttcgtggaaaccgcgatcaacctggcacgtcaatctcactgcactt
atcataacggcgacgcgcatacctctccggatgagctgaccgcaaacgcgttctgtctgtaatcactgaacgatttctgccg
tttgaacgctaaggatccgaattcgagctccgtcgacaagcttgcggccgcactcgagcaccaccaccaccaccactgag
atccggctgctaacaaagcccgaaaggaagctgagttggctgctgccaccgctgagcaataactagcataaccccttggg
gcctctaaacgggtcttgaggggttttttgctgaaaggaggaactatatccggat

(SEQ ID NO:109)

Fig. 137C

tggcgaatgggacgcgccctgtagcggcgcattaagcgcggcgggtgtggtggttacgcgcagcgtgaccgctacacttgcc
agcgccctagcgcccgctcctttcgctttcttcccttcctttctcgccacgttcgccggctttccccgtcaagctctaaatcgggggct
ccctttagggttccgatttagtgctttacggcacctcgaccccaaaaaacttgattagggtgatggttcacgtagtgggccatcgc
cctgatagacggtttttcgccctttgacgttggagtccacgttctttaatagtggactcttgttccaaactggaacaacactcaaccc
tatctcggtctattcttttgatttataagggattttgccgatttcggcctattggttaaaaaatgagctgatttaacaaaaatttaacgcg
aattttaacaaaatattaacgtttacaatttcaggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaacccctatttgtttatttttctaaatac
attcaaatatgtatccgctcatgaattaattcttagaaaaactcatcgagcatcaaatgaaactgcaatttattcatatcaggattat
caataccatatttttgaaaaagccgtttctgtaatgaaggagaaaactcaccgaggcagttccataggatggcaagatcctggt
atcggtctgcgattccgactcgtccaacatcaatacaacctattaatttcccctcgtcaaaaataaggttatcaagtgagaaatca
ccatgagtgacgactgaatccggtgagaatggcaaaagtttatgcatttctttccagacttgttcaacaggccagccattacgctc
gtcatcaaaatcactcgcatcaaccaaaccgttattcattcgtgattgcgcctgagcgagacgaaatacgcgatcgctgttaaa
aggacaattacaaacaggaatcgaatgcaaccggcgcaggaacactgccagcgcatcaacaatattttcacctgaatcagg
atattcttctaatacctggaatgctgttttccggggatcgcagtggtgagtaaccatgcatcatcaggagtacggataaaatgctt
gatggtcggaagaggcataaattccgtcagccagtttagtctgaccatctcatctgtaacatcattggcaacgctaccttgccat
gtttcagaaacaactctggcgcatcgggcttcccatacaatcgatagattgtcgcacctgattgcccgacattatcgcgagcccta
tttataccctatataaatcagcatccatgttggaatttaatcgcggcctagagcaagacgtttcccgttgaatatggctcataacacc
ccttgtattactgtttatgtaagcagacagttttattgttcatgaccaaaatcccttaacgtgagttttcgttccactgagcgtcagacc
ccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatcctttttttctgcgcgtaatctgctgcttgcaaacaaaaaaaccaccgctacca
gcggtggtttgtttgccggatcaagagctaccaactctttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaaatactg
tccttctagtgtagccgtagttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgctctgctaatcctgttaccag
tggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttggactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggtcgggc
tgaacggggggttcgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatga
gaaagcgccacgcttcccgaagggagaaaggcggacaggtatccggtaagcggcagggtcggaacaggagagcgcac
gagggagcttccagggggaaacgcctggtatctttatagtcctgtcgggtttcgccacctctgacttgagcgtcgatttttgtgatg
ctcgtcaggggggcggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggcctttttacggttcctggccttttgctggccttttgctcac
atgttctttcctgcgttatcccctgattctgtggataaccgtattaccgcctttgagtgagctgataccgctcgccgcagccgaacga
ccgagcgcagcgagtcagtgagcgaggaagcggaagagcgcctgatgcggtatttctccttacgcatctgtgcggtatttcac
accgcatatatggtgcactctcagtacaatctgctctgatgccgcatagttaagccagtatacactccgctatcgctacgtgactg
ggtcatggctgcgccccgacacccgccaacacccgctgacgcgccctgacgggcttgtctgctcccggcatccgcttacaga
caagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcagaggttttcaccgtcatcaccgaaacgcgcgaggcagctgcggtaaaa
gctcatcagcgtggtcgtgaagcgattcacagatgtctgcctgttcatccgcgtccagctcgttgagtttctccagaagcgttaatg
tctggcttctgataaagcgggccatgttaagggcggttttttcctgtttggtcactgatgcctccgtgtaagggggatttctgttcatgg
gggtaatgataccgatgaaacgagagaggatgctcacgatacgggttactgatgatgaacatgcccggttactggaacgttgt
gagggtaaacaactggcggtatggatgcggcgggaccagagaaaaatcactcagggtcaatgccagcgcttcgttaatacca
gatgtaggtgttccacagggtagccagcagcatcctgcgatgcagatccggaacataatggtgcagggcgctgacttccgcgt
ttccagacttacgaaacacggaaaccgaagaccattcatgttgttgctcaggtcgcagacgttttgcagcagcagtcgcttcac
gttcgctcgcgtatcggtgattcattctgctaaccagtaaggcaaccccgccagcctagccgggtcctcaacgacaggagcac
gatcatgcgcacccgtggggccgccatgccggcgataatggcctgcttctcgccgaaacgtttgggtggcgggaccagtgacg
aaggcttgagcgagggcgtgcaagattccgaataccgcaagcgacaggccgatcatcgtcgcgctccagcgaaagcggtc
ctcgccgaaaatgacccagagcgctgccggcacctgtcctacgagttgcatgataaagaagacagtcataagtgcggcgac
gatagtcatgccccgcgcccaccggaaggagctgactgggttgaaggctctcaagggcatcggtcgagatcccggtgccta
atgagtgagctaacttacattaattgcgttgcgctcactgcccgctttccagtcgggaaacctgtcgtgccagctgcattaatgaat
cggccaacgcgcggggagaggcggtttgcgtattgggcgccagggtggtttttcttttcaccagtgagacgggcaacagctga
ttgcccttcaccgcctggccctgagagagttgcagcaagcggtccacgctggtttgccccagcaggcgaaaatcctgtttgatg
gtggttaacggcgggatataacatgagctgtcttcggtatc

Fig. 137D

gtcgtatccactaccgagatatccgcaccaacgcgcagcccggactcggtaatggcgcgcattgcgcccagcgccat
ctgatcgttggcaaccagcatcgcagtgggaacgatgccctcattcagcatttgcatggtttgttgaaaaccggacatggc
actccagtcgccttcccgttccgctatcggctgaatttgattgcgagtgagatatttatgccagccagccagacgcagacg
cgccgagacagaacttaatgggcccgctaacagcgcgatttgctggtgacccaatgcgaccagatgctccacgccca
gtcgcgtaccgtcttcatgggagaaaataatactgttgatgggtgtctggtcagagacatcaagaaataacgccggaac
attagtgcaggcagcttccacagcaatggcatcctggtcatccagcggatagttaatgatcagcccactgacgcgttgcg
cgagaagattgtgcaccgccgctttacaggcttcgacgccgcttcgttctaccatcgacaccaccacgctggcacccagt
tgatcggcgcgagatttaatcgccgcgacaatttgcgacggcgcgtgcagggccagactggaggtggcaacgccaat
cagcaacgactgtttgcccgccagttgttgtgccacgcggttgggaatgtaattcagctccgccatcgccgcttccactttt
ccccgcgttttcgcagaaacgtggctggcctggttcaccacgcgggaaacggtctgataagagacaccggcatactctgc
gacatcgtataacgttactggtttcacattcaccaccctgaattgactctcttccgggcgctatcatgccataccgcgaaag
gttttgcgccattcgatggtgtccgggatctcgacgctctcccttatgcgactcctgcattaggaagcagcccagtagtagg
ttgaggccgttgagcaccgccgccgcaaggaatggtgcatgcaaggagatggcgcccaacagtcccccggccacggg
ggcctgccaccatacccacgccgaaacaagcgctcatgagcccgaagtggcgagcccgatcttccccatcggtgatgt
cggcgatataggcgccagcaaccgcacctgtggcgccggtgatgccggccacgatgcgtccggcgtagaggatcgga
gatctcgatcccgcgaaattaatacgactcactatagggaattgtgagcggataacaatttcccctctagaaataatttttgt
ttaacttaagaaggagatatacatatggttgtagcgtgtccaccgaaaaatgtgtcttttcaccgaaactgaaaccgaaac
gcgtcgttctgcgaactacgaacctaacagctgggactatgattacctgctgtcctccgacacggacgagtccatcgaag
tatacaaagacaaagcgaaaaagctggaagccgaagttcgtcgcgagattaataacgaaaaagcgaaatttctgacc
ctgccggaactgattgacaacgtccagcgcctgggcctgggttaccgttcgagtctgatatccgtcgtgcgctggatcgct
tcgttcctccggcggcttcgatgcggtaaccaagacttcctgcacgcgacggcactgtcttccgtctgctgcgtcaaca
cggttttgaggtttctcaggaagcgttcagcggcttcaaagaccaaaacggcaacttcctgaaaaacctgaaggaagat
atcaaagctatcctgagcctgtacgaggccagcttcctggctctggaaggcgaaaacatcctggacgaggcgaaggtt
tcgcaatctctcatctgaaagaactgtctgaagaaaagatcggtaaagatctggcagaacaggtgaaccatgcactgg
aactgccactgcatcgccgtactcagcgtctggaagcagtatggtctatcgaggcctacgtaaaaaggaggacgcgg
atcaggttctgctggagctggcaattctggattacaacatgatccagtctgtataccagcgtgatctgcgtgaaacgtcccg
ttggtggcgtctgtgtgggtctggcgaccaaactgcacttgctcgtgaccgcctgattgagagcttctactgggcggtgggt
gtagcattcgaacgcaatactccgactgccgtaactccgtccgcaaaaatgttttcttcgtaaccatttatgacgatatcta
cgatgtatacggcaccctggacgaactggagctgtttactgacgcagttgagcgttgggacgtaaacgccatcgacgat
ctgccggattacatgaaactgtgctttctggctctgtataacactattaacgaaatgcctacgacaacctgaaagataaa
ggtgagaacatcctgccgtatctgaccaaagcctgggctgacctgtgcaagcgttcctgcaagaagccaagtggctgt
acaacaaatctactccgaccttgacgaatacttcggcaacgcatggaaatcctcttctggccgctgcaacttggtgttcg
cttacttcgctgtcgtgcagaacattaaaaaggaagagatcgataacctgcaaaaataccatgacatcatctctgtcctt
cccatatcttccgtctgtgcaatgacctggctagcgcgtctgcggaaattgcgcgtggtgaaaccgcaaatagcgtttctg
ttacatgcgcactaaaggtatctccgaagaactggctaccgaaagcgtgatgaatctgatcgatgaaaccttggaaaaa
gatgaacaaggaaaaactgggtggtagcctgttcgcgaaaccgttcgtggaaaccgcgatcaacctggcacgtcaatc
tcactgcacttatcataacggcgacgcgcatacctctccggatgagctgaccgcaaacgcgttctgtctgtaatcactga
accgatctgccgttgaacgctaaggatccgaattcgagctccgtcgacaagcttgcggccgcactcgagcaccacca
ccaccaccactgagatccggctgctaacaaagcccgaaaggaagctgagttggctgctgccaccgctgagcaataac
tagcataaccccttggggcctctaaacgggtcttgaggggttttttgctgaaaggaggaactatatccggat

(SEQ ID NO:110)

Fig. 137E

tggcgaatgggacgcgccctgtagcggcgcattaagcgcggcgggtgtggtggttacgcgcagcgtgaccgctacacttgc
cagcgccctagcgcccgctcctttcgctttcttcccttcctttctcgccacgttcgccggcttccccgtcaagctctaaatcgggg
gctcccttagggttccgatttagtgctttacggcacctcgaccccaaaaaacttgattagggtgatggttcacgtagtgggcca
tcgccctgatagacggttttcgcccttgacgttggagtccacgttcttaatagtggactcttgttccaaactggaacaacactc
aaccctatctcggtctattcttttgatttataagggattttgccgatttcggcctattggttaaaaaatgagctgatttaacaaaaatttt
aacgcgaattttaacaaaatattaacgtttacaatttcaggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaacccctatttgtttatttt
ictaaatacattcaaatatgtatccgctcatgaattaattcttagaaaaactcatcgagcatcaaatgaaactgcaatttattcata
tcaggattatcaataccatatttttgaaaaagccgtttctgtaatgaaggagaaaactcaccgaggcagttccataggatggc
aagatcctggtatcggtctgcgattccgactcgtccaacatcaatacaacctattaatttcccctcgtcaaaaataaggttatca
agtgagaaatcaccatgagtgacgactgaatccggtgagaatggcaaaagtttatgcatttctttccagacttgttcaacaggc
cagccattacgctcgtcatcaaaatcactcgcatcaaccaaaccgttattcattcgtgattgcgcctgagcgagacgaaatac
gcgatcgctgttaaaaggacaattacaaacaggaatcgaatgcaaccggcgcaggaacactgccagcgcatcaacaat
attttcacctgaatcaggatattcttctaatacctggaatgctgtttcccggggatcgcagtggtgagtaaccatgcatcatcag
gagtacggataaaatgcttgatggtcggaagaggcataaattccgtcagccagtttagtctgaccatctcatctgtaacatcatt
ggcaacgctaccttgccatgtttcagaaacaactctggcgcatcgggcttcccatacaatcgatagattgtcgcacctgattg
cccgacattatcgcgagcccatttatacccatataaatcagcatccatgttggaatttaatcgcggcctagagcaagacgtttc
ccgttgaatatggctcataacaccccttgtattactgtttatgtaagcagacagttttattgttcatgaccaaaatcccttaacgtga
gttttcgttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatcctttttttctgcgcgtaatctgctgcttg
caaacaaaaaaaccaccgctaccagcggtggtttgtttgccggatcaagagctaccaactctttttccgaaggtaactggctt
cagcagagcgcagataccaaatactgtccttctagtgtagccgtagttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccgcct
acatacctcgctctgctaatcctgttaccagtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttggactcaagacgat
agttaccggataaggcgcagcgggtcgggctgaacggggggttcgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacctacac
cgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcgccacgcttcccgaagggagaaaggcggacaggtatccggt
aagcggcagggtcggaacaggagagcgcacgagggagcttccagggggaaacgcctggtatctttatagtcctgtcgggt
ttcgccacctctgacttgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcaggggggcggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggc
cttttacggttcctggccttttgctggccttttgctcacatgttcttcctgcgttatcccctgattctgtggataaccgtattaccgccttt
gagtgagctgataccgctcgccgcagccgaacgaccgagcgcagcgagtcagtgagcgaggaagcggaagagcgcct
gatgcggtatttctccttacgcatctgtgcggtatttcacaccgcatatatggtgcactctcagtacaatctgctctgatgccgcat
agttaagccagtatacactccgctatcgctacgtgactgggtcatggctgcgccccgacacccgccaacacccgctgacgc
gccctgacgggcttgtctgctcccggcatccgcttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcagaggttttc
accgtcatcaccgaaacgcgcgaggcagctgcggtaaagctcatcagcgtggtcgtgaagcgattcacagatgtctgcctg
ttcatccgcgtccagctcgttgagtttctccagaagcgttaatgtctggcttctgataaagcgggccatgttaagggcggttttttc
ctgtttggtcactgatgcctccgtgtaagggggatttctgttcatgggggtaatgataccgatgaaacgagagaggatgctcac
gatacgggttactgatgatgaacatgcccggttactggaacgttgtgagggtaaacaactggcggtatggatgcggcgggga
ccagagaaaaatcactcagggtcaatgccagcgcttcgttaatacagatgtaggtgttccacagggtagccagcagcatcc
tgcgatgcagatccggaacataatggtgcagggcgctgacttccgcgtttccagacttacgaaacacggaaaccgaaga
ccattcatgttgttgctcaggtcgcagacgttttgcagcagcagtcgcttcacgttcgctcgcgtatcggtgattcattctgctaac
cagtaaggcaaccccgccagcctagccgggtcctcaacgacaggagcacgatcatgcgcacccgtggggccgccatgc
cggcgataatggcctgcttctcgccgaaacgtttggtggcgggaccagtgacgaaggcttgagcgagggcgtgcaagattc
cgaatacccgcaagcgacaggccgatcatcgtcgcgctccagcgaaagcggtcctcgccgaaaatgacccagagcgctg
ccggcaccctgtcctacgagttgcatgataaagaagacagtcataagtgcggcgacgatagtcatgccccgcgcccaccgg
aaggagctgactgggttgaaggctctcaagggcatcggtcgagatcccggtgcctaatgagtgagctaactcacattaattgc
gttgcgctcactgcccgctttccagtcgggaaacctgtcgtgccagctgcattaatgaatcggccaacgcgcggggagagg
cggtttgcgtattgggcgccagggtggtttttcttttcaccagtgagacgggcaacagctgattgcccttcaccgcctggccctg
agagagttgcagcaagcggtccacgctggtttgccccagcaggcgaaaatcctgtttgatggtggttaacggcgggatataa
catgagctgtcttcggtatc

Fig. 137F

gtcgtatcccactaccgagatatccgcaccaacgcgcagcccggactcggtaatggcgcgcattgcgcccagcgccatctgat
cgttggcaaccagcatcgcagtgggaacgatgccctcattcagcatttgcatggtttgttgaaaaccggacatggcactccagtc
gccttcccgttccgctatcggctgaatttgattgcgagtgagatatttatgccagccagccagacgcagacgcgccgagacaga
acttaatgggcccgctaacagcgcgatttgctggtgacccaatgcgaccagatgctccacgcccagtcgcgtaccgtcttcatgg
gagaaaataatactgttgatgggtgtctggtcagagacatcaagaaataacgccggaacattagtgcaggcagcttccacagc
aatggcatcctggtcatccagcggatagttaatgatcagcccactgacgcgttgcgcgagaagattgtgcaccgccgctttacag
gcttcgacgccgcttcgttctaccatcgacaccaccacgctggcacccagttgatcggcgcgagatttaatcgccgcgacaattt
gcgacggcgcgtgcagggccagactggaggtggcaacgccaatcagcaacgactgtttgcccgccagttgttgtgccacgcg
gttgggaatgtaattcagctccgccatcgccgcttccactttttcccgcgttttcgcagaaacgtggctggcctggttcaccacgcgg
gaaacggtctgataagagacaccggcatactctgcgacatcgtataacgttactggtttcacattcaccaccctgaattgactctct
tccgggcgctatcatgccataccgcgaaaggttttgcgccattcgatggtgtccgggatctcgacgctctccttatgcgactcctg
cattaggaagcagcccagtagtaggttgaggccgttgagcacgccgccgcaaggaatggtgcatgcaaggagatggcgccc
caacagtcccccggccacggggcctgccaccataccacgccgaaacaagcgctcatgagcccgaagtggcgagcccgat
cttccccatcggtgatgtcggcgatataggcgccagcaaccgcacctgtggcgccggtgatgccggccacgatgcgtccggcg
tagaggatcgagatctcgatcccgcgaaattaatacgactcactatagggaattgtgagcggataacaatttcacacctagaaat
aattttgtttaactttaagaaggagatatacatatgcgttgtagcgtgtccaccgaaaatgtgtcttctctgaaactgaaaccgaaac
gcgtcgttctgcgaactacgaacctaacagctgggactatgattacctgctgtcctccgacacggacgagtccatcgaagtacac
aaagacaaagcgaaaaagctggaagccgaagttcgtcgcgagattaataacgaaaaagcagaatttctgaccctgctggaa
ctgattgacaacgtccagcgccttgggcctgggttaccgtttcgagtctgatatccgtcgtgcgctggatcgcttcgttcctccggcg
gcttcgatggcgtaaccaagacttcctgcacggtacggcactgtcttttcgtctgctgcgtcaacacggttttgaggtttctcaggca
agcgttcagcggcttcaaagaccaaaacggcaacttcctggagaacctgaaggaagatatcaaagctatcctgagcctgtacg
aggccagcttcctggctctggaaggcgaaaacatcctggacgaggcgaaggtttcgcaatctctcatctgaaagaactgtctga
agaaaagatcggtaaagagctggcagaacaggtgtccatgcactggaactgccactgcatcgccgtactcagcgtctggaa
gcagtatggtctatcgaggcctaccgtaaaaaggaggacgcgaaccaggttctgctggagctggcaattctggattacaacatg
atccagtctgtataccagcgtgatctgcgtgaaacgtccgttggtggcgtcgtgtgggtctggcgaccaaaactgcacttgctcgt
gaccgcctgattgagagcttctactgggccgtgggtgtagcattcgaaccgcaatactccgactgccgtaactccgtcgcaaaaa
tgttttcttcgtaaccattatcgacgatatctacgatgtatacggcaccctggacgaactggagctgttactgatgcagttgagcgtt
gggacgtaaacgccatcaacgacctgccggattacatgaaaactgtgcttctggctctgtataacactattaacgaaatcgcctac
gacaaactgaaagataaaggtgagaacatcctgccgtatctgaccaaagcctgggctgacctgtgcaaacgcttcctgcaaga
agccaagtggctgtacaacaaatctactccgaccttgacgactacttcggcaacgcatggaaatcctcttctggcccgctgcaa
ctgatcttcgcttacttcgctgtcgtgcagaacattaaaaaggaagagatcgaaaacctgcaaaaataccatgacatcatctctcg
tccttcccatatcttccgtctgtgcaatgacctggctagcgcgtctgcggaaattgcgcgtggtgaaacgcaaatagcgtttcttgtt
acatgcgcactaaaggtatctccgaagaactggctaccgaaagcgtgatgaatctgatcgatgaaacctggaaaaagatgaa
caaggaaaaaactgggtggtagcctgttcgcgaaacgttcgtggaaacgcgatcaacctggcacgtcaatctcactgcacttа
tcataacggcgacgcgcataccctctccggatgagctgaccgcaaacgcgttctgtctgtaatcactgaacgattctgcgtttg
aacgctaaggatccgaattcgagctccgtcgacaagcttgcggccgcactcgagcaccaccaccaccaccactgagatccgg
ctgctaacaaagcccgaaaggaagctgagttggctgctgccaccgctgagcaataactagcataaccccttggggcctctaaa
cgggtcttgaggggttttttgctgaaaggaggaactatatccggat

(SEQ ID NO:123)

Fig. 137G

MRCSVSTENVSFSETETETRRSANYEPNSWDYDYLLSSDTDESIEVHKDKAKKL
EAEVRREINNEKAEFLTLLELIDNVQRLGLGYRFESDIRRALDRFVSSGGFDGVT
KTSLHGTALSFRLLRQHGFEVSQEAFSGFKDQNGNFLENLKEDIKAILSLYEASFL
ALEGENILDEAKVFAISHLKELSEEKIGKELAEQVSHALELPLHRRTQRLEAVWSIE
AYRKKEDANQVLLELAILDYNMIQSVYQRDLRETSRWWRRVGLATKLHFARDRL
IESFYWAVGVAFEPQYSDCRNSVAKMFSFVTIIDDIYDVYGTLDELELFTDAVER
WDVNAINDLPDYMKLCFLALYNTINEIAYDNLKDKGENILPYLTKAWADLCNAFLQ
EAKWLYNKSTPTFDDYFGNAWKSSSGPLQLIFAYFAVVQNIKKEEIENLQKYHDII
SRPSHIFRLCNDLASASAEIARGETANSVSCYMRTKGISEELATESVMNLIDETW
KKMNKEKLGGSLFAKPFVETAINLARQSHCTYHNGDAHTSPDELTRKRVLSVITE
PILPFER

(SEQ ID NO: 124)

Fig. 137H

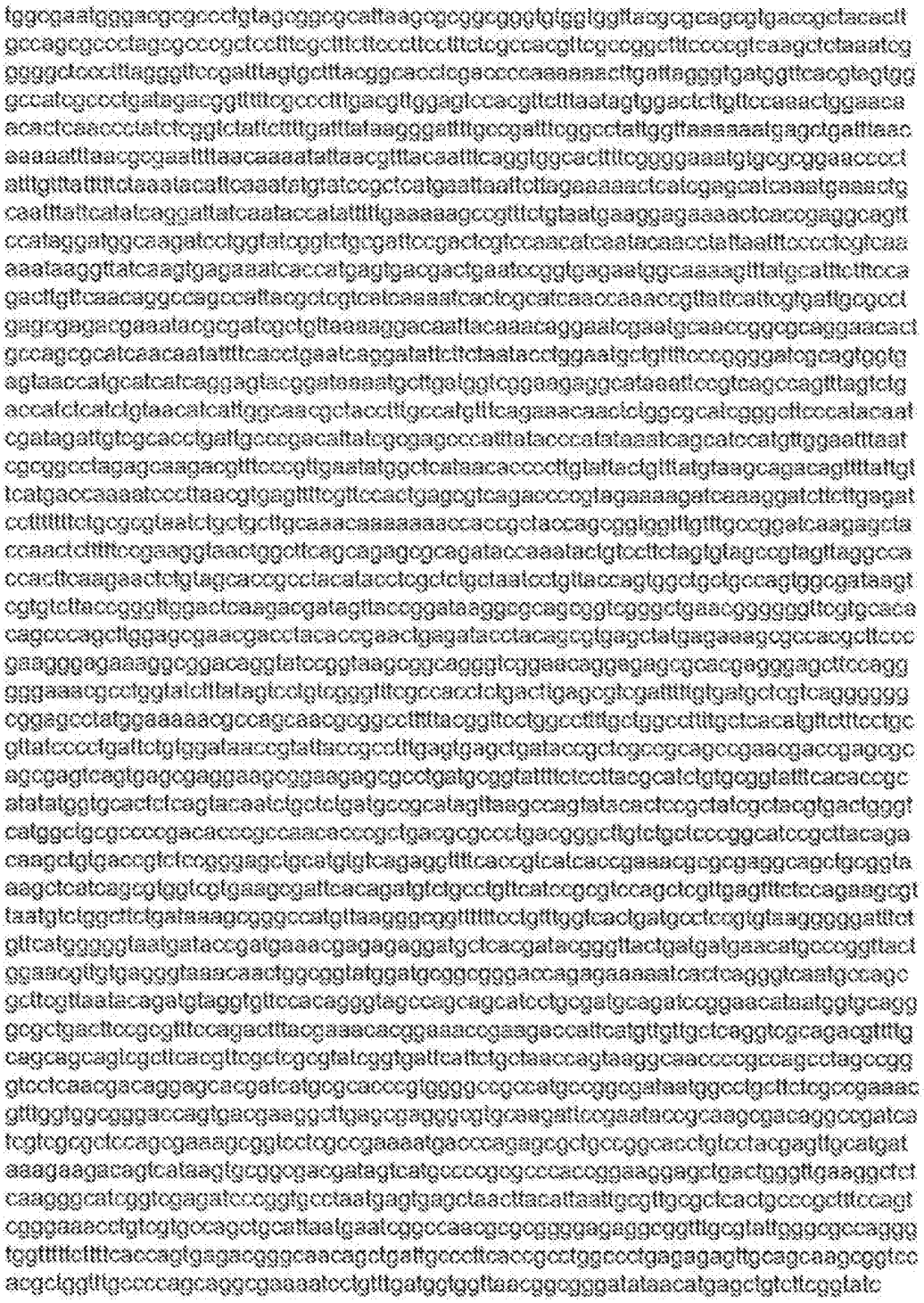


Fig. 137I

gtcgtatcccactaccgagatatccgcaccaacgcgcagcccggactcggtaatggcgcgcattgcgcccagcgccatc
tgatcgttggcaaccagcatcgcagtgggaacgatgccctcattcagcatttgcatggtttgttgaaaaccggacatggcac
tccagtcgccttccgttccgctatcggctgaatttgattgcgagtgagatatttatgccagccagccagacgcagacgcgc
cgagacagaacttaatgggcccgctaacagcgcgatttgctggtgacccaatgcgaccagatgctccacgcccagtcgc
gtaccgtcttcatgggagaaaataatactgttgatgggtgtctggtcagagacatcaagaaataacgccggaacattagtg
caggcagcttccacagcaatggcatcctggtcatccagcggatagttaatgatcagcccactgacgcgttgcgcgagaag
attgtgcaccgccgctttacaggcttcgacgccgcttcgttctaccatcgacaccaccacgctggcacccagttgatcggcg
cgagatttaatcgccgcgacaatttgcgacggcgcgtgcagggccagactggaggtggcaacgccaatcagcaacga
ctgtttgcccgccagttgttgtgccacgcggttgggaatgtaattcagctccgccatcgccgcttccactttttcccgcgttttcgc
agaaacgtggctggcctggttcaccacgcgggaaacggtctgataagagacaccggcatactctgcgacatcgtataac
gttactggtttcacattcaccaccctgaattgactctcttccgggcgctatcatgccataccgcgaaaggttttgcgccattcga
tggtgtccgggatctcgacgctctcccttatgcgactcctgcattaggaagcagcccagtagtaggttgaggccgttgagca
ccgccgccgcaaggaatggtgcatgcaaggagatggcgcccaacagtcccccggccacggggcctgccaccataccc
cacgccgaaacaagcgctcatgagcccgaagtggcgagcccgatcttccccatcggtgatgtcggcgatataggcgcc
agcaaccgcacctgtggcgccggtgatgccggccacgatgcgtccggcgtagaggatcgagatctcgatcccgcgaaa
ttaatacgactcactatagggagattgtgagcggataacaattcccctctagaaataattttgtttaactttaagaaggagatat
acatatgcatatgcgttgtagcgtgtccacccgaaaatgtgtcttcaccgaaactgaaaccgaaacgcgtcgttctgcgaaac
tacgaacctaacagctgggactatgattacctgctgtcctccgacacggacgagtccatcgaagtatacaaagacaaag
cgaaaaagctggaagccgaagttcgtcgcgagattaataacgaaaaagcagaatttctgaccctgctggaactgattga
caacgtccagcgcctgggcctgggttaccgtttcgagtctgatatccgtcgtgcgctggatcgcttcgtttcctccggcggcttc
gatgcggtaaccaagacttcccctgcacgcgaccggcactgtctttccgtctgctgcgtcaacaccgttttgaggtttctcagga
agcgttcagcggcttcaaagaccaaaaacggcaacttcctggagaacctgaaggaagatatcaaagctatcctgagcctg
tacgaggccagcttcctggctctggaaggcgaaaacatcctggacgaggcgaaggttttcgcaatctctcatctgaaaga
actgtctgaagaaaagatcggtaaagatctggcagaacaggtgaaccatgcactggaactgccactgcatgccgtact
cagcgtctggaagcagtactgtctatcgaggcctaccgtaaaaaggaggacgcggatcaggttctgctggagctggcaat
tctggattacaacatgatccagtctgtataccagcgtgatctgcgtgaaacgtccgttggtgggtcgtgtgggtctggcga
ccaaactgcacttgctcgtgaccgcctgattgagagcttctactgggccgtgggtgtagcattcgaaccgcaatactcgga
ctgccgtaactccgtcgcaaaaatgttttcttttcgtaaccattatcgacgatatctacgatgtatacggcaccctggacgaact
ggagctgttactaacgcagttgagcgttgggacgtaaacgccatcgacgatctgccggattacatgaaactgtgctttctgg
ctctgtataacactattaacgaaatcgcctacgacaacctgaaagaaaaaggtgagaacatcctgccgtatctgaccaaa
gcctgggctgacctgtgcaacgcttcctgcaagaagccaagtggctgtacaacaaatctactccgaccttgacgaatact
tcggcaacgcatggaaatcctcttctggccgctgcaactggtgttcgcttacttcgctgtcgtgcagaacattaaaaagga
agagatcgaaaacctgcaaaaatacccatgacatcatctctcgtcctttccatatcttccgtctgtgcaatgacctggctagcg
cgtctgcggaaattgcgcgtggtgaaaccgcaaatagcgtttcttgttacatgcgcactaaaggtatctccgaagaactggc
taccgaaaagcgtgatgaatctgatcgatgaaacctggaaaaagatgaacaaggaaaaactgggtggtagcctgttcgcg
aaacgttcgtggaaaccgcgatcaacctggcacgtcaatctcactgcacttatcataacggcgacgcgcatacctctccg
gatgagctgaccgcaaacgcgttctgtctgtaatcactgaacgatttctgccgtttgaacgctaaggatccgaattcgagc
tccgtcgacaagcttgcggccgcactcgagcaccaccaccaccaccactgagatccggctgctaacaaagcccgaaa
ggaagctgagttggctgctgccaccgctgagcaataactagcataaccccttggggcctctaaacgggtcttgaggggttttt
ttgctgaaaggaggaactatatccggat

(SEQ ID NO:111)

Fig. 137J

tggcgaatgggacgcgccctgtagcggcgcattaagcgcggcgggtgtggtggttacgcgcagcgtgaccgctacactt
gccagcgccctagcgcccgctcctttcgctttcttcccttcctttctcgccacgttcgccggctttccccgtcaagctctaaatcg
ggggctccctttagggttccgatttagtgctttacggcacctcgaccccaaaaaacttgattagggtgatggttcacgtagtgg
gccatcgccctgatagacggtttttcgccctttgacgttggagtccacgttctttaatagtggactcttgttccaaactggaaca
acactcaaccctatctcggtctattcttttgatttataagggattttgccgatttcggcctattggttaaaaaatgagctgatttaac
aaaaatttaacgcgaattttaacaaaatattaacgtttacaatttcaggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaacccct
atttgtttatttttctaaatacattcaaatatgtatccgctcatgaattaattcttagaaaaactcatcgagcatcaaatgaaactg
caatttattcatatcaggatttatcaataccatatttttgaaaaagccgtttctgtaatgaaggagaaaactcaccgaggcagtt
ccataggatggcaagatcctggtatcggtctgcgattccgactcgtccaacatcaatacaacctattaatttcccctcgtcaa
aaataaggttatcaagtgagaaatcaccatgagtgacgactgaatccggtgagaatggcaaaagtttatgcatttctttcca
gacttgttcaacaggccagccattacgctcgtcatcaaaatcactcgcatcaaccaaaccgttattcattcgtgattgcgcct
gagcgagacgaaatacgcgatcgctgttaaaaggacaattacaaacaggaatcgaatgcaaccggcgcaggaacact
gccagcgcatcaacaatattttcacctgaatcaggatattcttctaatacctggaatgctgttttccggggatcgcagtggtg
agtaaccatgcatcatcaggagtacggataaaatgcttgatggtcggaagaggcataaattccgtcagccagtttagtctg
accatctcatctgtaacatcattggcaacgctaccttgccatgtttcagaaacaactctggcgcatcgggcttcccatacaat
cgatagattgtcgcacctgattgcccgacattatcgcgagcccatttatacccatataaatcagcatccatgttggaatttaat
cgcggcctagagcaagacgtttcccgttgaatatggctcataacaccccttgtattactgtttatgtaagcagacagtttattgt
tcatgaccaaaatccctaacgtgagttttcgttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagat
ccttttttctgcgcgtaatctgctgcttgcaaacaaaaaaaccaccgctaccagcggtggtttgtttgccggatcaagagcta
ccaactctttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaaatactgtccttctagtgtagccgtagttaggcca
ccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgctctgctaatcctgttaccagtggctgctgccagtggcgataagt
cgtgtcttaccgggttggactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggtcgggctgaacgggggggttcgtgcaca
cagcccagcttggagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcgccacgcttccc
gaagggagaaaggcggacaggtatccggtaagcggcagggtcggaacaggagagcgcacgagggagcttccagg
gggaaacgcctggtatctttatagtcctgtcgggtttcgccacctctgacttgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcaggggg
cggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggcctttttacggttcctggccttttgctggccttttgctcacatgttctttcctgc
gttatcccctgattctgtggataaccgtattaccgcctttgagtgagctgataccgctcgccgcagccgaacgaccgagcgc
agcgagtcagtgagcgaggaagcggaagagcgcctgatgcggtatttctccttacgcatctgtgcggtatttcacaccgc
atatatggtgcactctcagtacaatctgctctgatgccgcatagttaagccagtatacactccgctatcgctacgtgactgggt
catggctgcgccccgacacccgccaacaccgctgacgcgccctgacgggcttgtctgctcccggcatccgcttacaga
caagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcagaggttttcaccgtcatcaccgaaacgcgcgaggcagctgcggta
aagctcatcagcgtggtcgtgaagcgattcacagatgtctgcctgttcatccgcgtccagctcgttgagtttctccagaagcgt
taatgtctggcttctgataaagcgggccatgttaagggcggttttttcctgtttggtcactgatgcctccgtgtaagggggatttct
gttcatgggggtaatgataccgatgaaacgagagaggatgctcacgatacgggttactgatgatgaacatgcccggttact
ggaacgttgtgagggtaaacaactggcggtatggatgcggcgggaccagagaaaaatcactcagggtcaatgccagc
gcttcgttaatacagatgtaggtgttccacagggtagccagcagcatcctgcgatgcagatccggaacataatggtgcagg
gcgctgacttccgcgtttccagactttacgaaacacggaaaccgaagaccattcatgttgttgctcaggtcgcagacgttttg
cagcagcagtcgcttcacgttcgctcgcgtatcggtgattcattctgctaaccagtaaggcaaccccgccagcctagccgg
gtcctcaacgacaggagcacgatcatgcgcacccgtggggccgccatgccggcgataatggcctgcttctcgccgaaacc
gtttggtggcgggaccagtgacgaaggcttgagcgagggcgtgcaagattccgaataccgcaagcgacaggccgatca
tcgtcgcgctccagcgaaagcggtcctcgccgaaaatgacccagagcgctgccggcacctgtcctacgagttgcatgat
aaagaagacagtcataagtgcggcgacgatagtcatgccccgcgcccaccggaaggagctgactgggttgaaggctct
caagggcatcggtcgagatcccggtgcctaatgagtgagctaacttacattaattgcgttgcgctcactgcccgctttccagt
cgggaaacctgtcgtgccagctgcattaatgaatcggccaacgcgcggggagaggcggtttgcgtattgggcgccaggg
tggttttcttttcaccagtgagacgggcaacagctgattgcccttcaccgcctggccctgagagagttgcagcaagcggtcc
acgctggtttgccccagcaggcgaaaatcctgtttgatggtggttaacggcgggatataacatgagctgtcttcggtatc

Fig. 137K

gtcgtatcccactacgagatatccgcaccaacgcgcagcccggactcggtaatggcgcgcattgcgcccagcgccatctg
atcgttggcaaccagcatcgcagtgggaacgatgccctcattcagcatttgcatggttgttgaaaaccggacatggcactcca
gtcgccttcccgttccgctatcggctgaatttgattgcgagtgagatatttatgccagccagccagacgcagacgcgccgagac
agaacttaatgggcccgctaacagcgcgatttgctggtgacccaatgcgaccagatgctccacgcccagtcgcgtaccgtctt
catgggagaaaataatactgttgatgggtgtctggtcagagacatcaagaaataacgccggaacattagtgcaggcagcttcc
acagcaatggcatcctggtcatccagcggatagttaatgatcagcccactgacgcgttgcgcgagaagattgtgcaccgccg
ctttacaggcttcgacgccgcttcgttctaccatcgacaccaccacgctggcacccagttgatcggcgcgagatttaatcgccg
cgacaatttgcgacggcgcgtgcagggccagactggaggtggcaacgccaatcagcaacgactgtttgcccgccagttgttg
tgccacgcggttgggaatgtaattcagctccgccatcgccgcttccactttttcccgcgttttcgcagaaacgtggctggcctggtt
caccacgcgggaaacggtctgataagagacaccggcatactctgcgacatcgtataacgttactggtttcacattcaccaccct
gaattgactctcttccgggcgctatcatgccataccgcgaaaggttttgcgccattcgatggtgtccgggatctcgacgctctccct
tatgcgactcctgcattaggaagcagcccagtagtaggttgaggccgttgagcaccgccgccgcaaggaatggtgcatgcaa
ggagatggcgcccaacagtcccccggccacggggcctgccaccatacccacgccgaaacaagcgctcatgagcccgaa
gtggcgagcccgatcttccccatcggtgatgtcggcgatataggcgccagcaaccgcacctgtggcgccggtgatgccggcc
acgatgcgtccggcgtagaggatcgagatctcgatcccgcgaaattaatacgactcactataggggaattgtgagcggataa
caattcccctctagaaataattttgtttaacttaagaaggagatatacatatgtgctctgtttctaccgagaaacgtttccttcactgag
acggaaaccgaggcacgtcgtagcggcgaactacgagccgaatagctgggactacgatttcctgctgtcttccgatactgacg
aatctattgaggtgtacaaagacaaagcaaagaaactggaggctgaagtgccgccgaaaattaacaacgagaaaagctga
attcctgactctgctggagctgatcgataacgtacagcgcctgggtctgggttaccgcttcgaatctgatatccgtcgcgcactgg
atcgtttcgtaagcagcgggcggtttcgatgggtgaccaaaacgagcctgcacgctaccgcgctgtccttccgtctgctgcgtca
gcacggcttcgaagtttctcaggaagcattctccggttcaaagatcaaaacggtaacttcctggaaaacctgaaagaagaca
ctaaggcgatcctgagcctgtatgaggcaagcttctggcctggagggtgagaacatcctggatgaggcgcgctattctcca
tctcccatctgaaagagctgtctgaagagaaaatcggtaaggaactggcagagcaggttaatcacgcactggaactgccgct
gcatcgtcgtaccagcgtctggaggcggttggtccatcgaagcgtaccgcaaaaaggaggatgctaaccaggttctgctgg
aactggccatcctggactacaacatgatccagtccgtttaccagcgtgatctgcgtgaaacctccgttggtggcgccgtgtgg
gcctggcgaccaaactgcacttcgctaaggacgcctgattgagtcttttactgggcagtcggcgttcgttcgaacctcagtat
tctgactgccgtaacagcgttgcgaaaatgttcagcttcgttactattatcgacgacatctacgacgtttacggtactctggacgag
ctggaactgtttaccgacgctgtcgaacgttgggatgttaacgccatcaacgatctgcctgactacatgaaaatgtgcttcctggc
actgtataacacgatcaacgaaattgcatacgacaacctgaaagacaaaggtgaaaacatcctgccgtacctgactaaagc
gtgggcggatctgtgtaacgctttctgcaagaagcgaaatggctgtataacaaatccactccgaccttgacgattatttcggca
atgcctggaaatccagctctggccgctgcaactgatcttcgcttatttgcggttgtccaaaaacatcaaaaaggaggaaaattga
aaacctgcaaaaatacccacgatatcattagccgtccttctcatatcttcgcctgtgcaacgacctggcaagcgcgtccgcaga
gatcgcacgtggcgaaaccgctaactctgtttcctgctacatgcgcaccaagggcatttccgaagagctggcaaccgagagc
gtaatgaatctgatcgacgaaacctgtaagaaaatgaacaaagaaaaactgggtggctcctgttcgctaaaccgttcgtaga
gactgctattaacctggcacgtcagagccactgcacctaccacaatggtgacgcacatactagcccggatgaactgactcgta
aacgtgtactgtctgtatcaccgaaccgattctgccgttcgaacgttaactgcagctggtaggatccgaattcgagctccgtcga
caagcttgcggccgcactcgagcaccaccaccaccaccactgagatccggctgctaacaaagcccgaaaggaagctgag
ttggctgctgccaccgctgagcaataactagcataaccccttggggcctctaaacgggtcttgaggggttttttgctgaaaggag
gaactatatccggat

(SEQ ID NO:112)

Fig. 137L

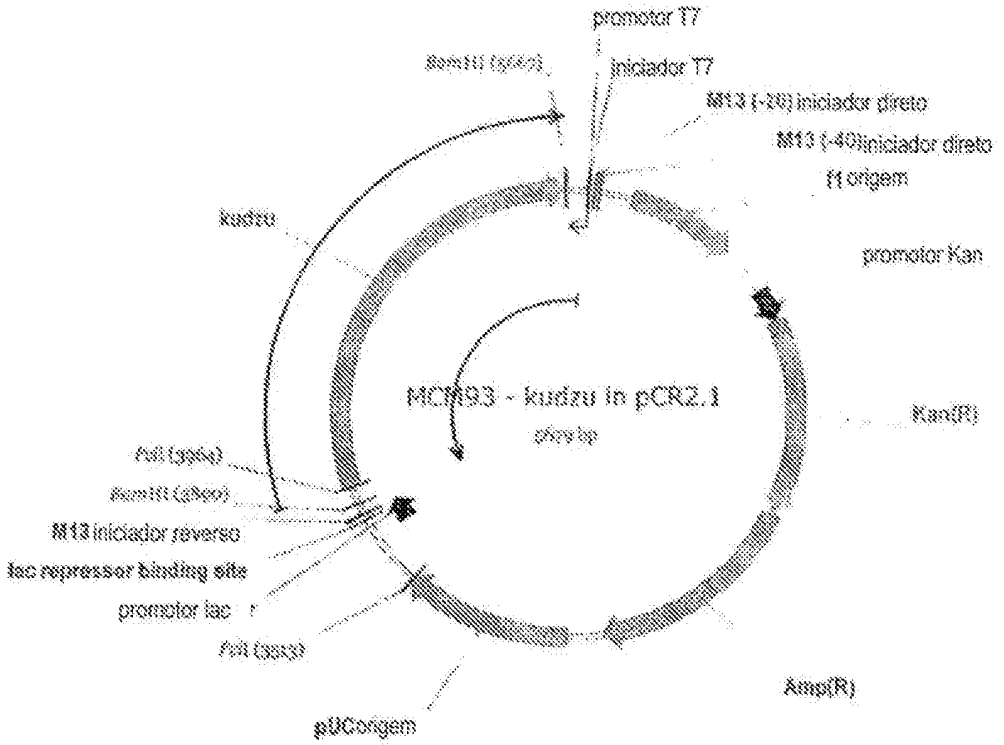

promotor T7
iniciador T7
M13 (-20) iniciador direto
M13 (-40)iniciador direto
f1 origem
promotor Kan
Kan(R)
Amp(R)
pUCorigem
M13 iniciador reverso
lac repressor binding site
promotor lac
MCM93 - kudzu in pCR2.1
clone lap

Fig. 137M

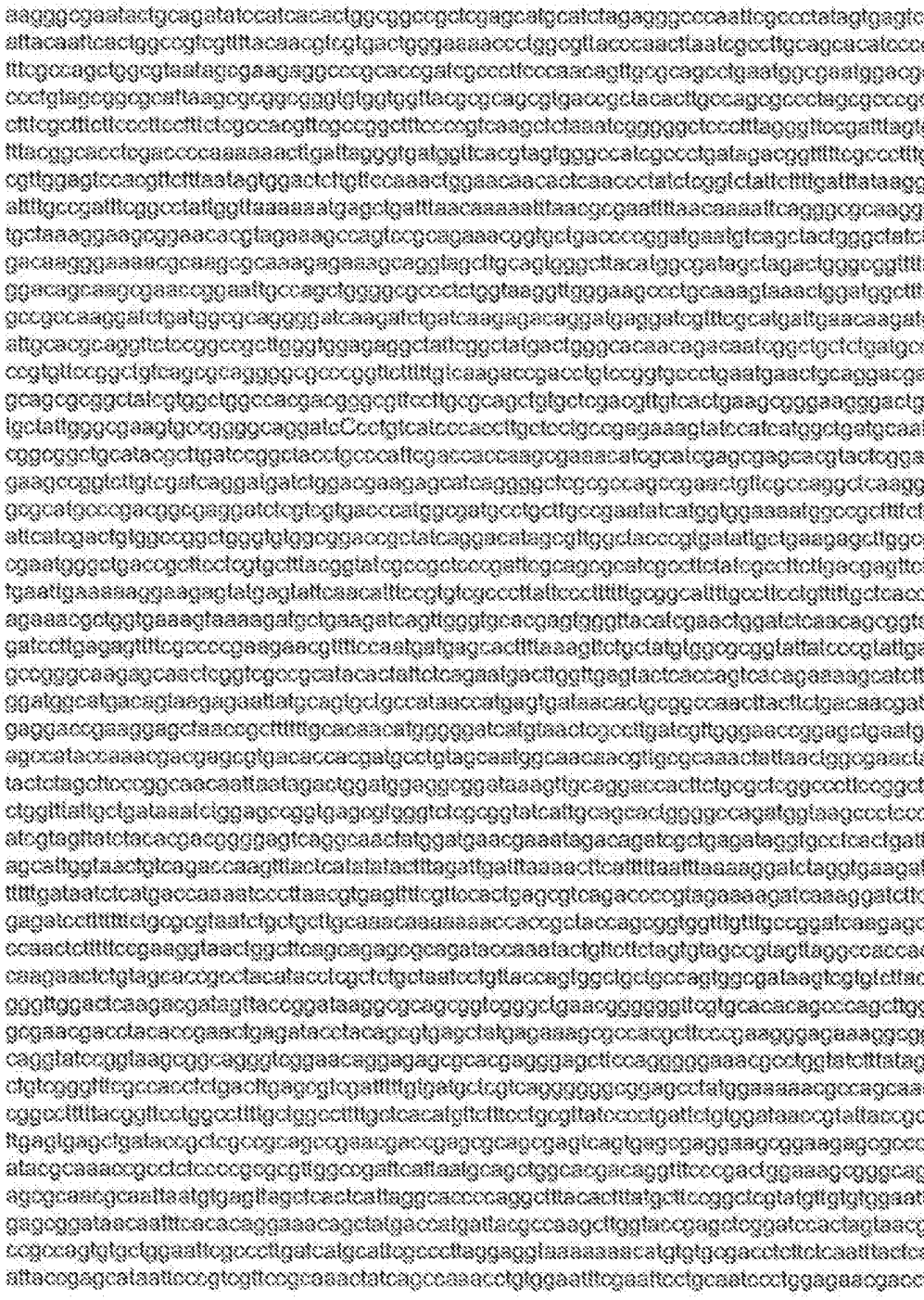


Fig. 137N

aaagtggaaaagctggaggagaaagcgaccaaactggaggaagaagttcgctgcatgatcaaccgtgtagacacccc
gccgctgtccctgctggagctgatcgacgatgtgcagcgcctgggtctgacctacaaatttgaaaaagacatcatta
aagccctggaaaacatcgtactgctggacgaaaacaaaaagaacaaatctgacctgcacgcaaccgctctgtctttc
cgtctgctgcgtcagcacggtttcgaggtttctcaggatgttttgagcgtttcaaggataaagaaggtggtttcag
cggtgaactgaaaggtgacgtccaaggcctgctgagcctgtatgaagcgtcttacctgggtttcgagggtgagaacc
tgctggaggaggcgcgtaccttttccatcacccacctgaagaacaacctgaaagaaggcattaataccaaggttgca
gaacaagtgagccacgccctggaactgccatatcaccagcgtctgcaccgtctggaggcacgttggttcctggataa
atacgaaccgaaagaaccgcatcaccagctgctgctggagctggcgaagctggatttaacatggtacagaccctgc
accagaaagagctgcaagatctgtccgctggtggaccgagatgggcctggctagcaaactggacttttgtacgcgac
cgcctgatggaagtttatttctgggcactgggtatggcgccagacccgcagtttggtgaatgtcgcaaagctgttac
taaaatgtttggtctggtgacgatcatcgatgacgtgtatgacgtttatggcactctggacgaactgcaactgttca
ccgatgctgtagagcgctgggacgttaacgctattaacaccctgccggactatatgaaactgtgtttcctggcactg
tacaaacaccgttaacgacacgtcctatttctatttctgaaagagaaaggtcataacaacctgtcctatccgacgaaaag
ctggcgtgaactgtgcaaagcctttctgcaagaggcgaaatggtccaacaacaaaattatcccggctttctccaagt
acctggaaaacgccagcgtttcctcctccggtgtagcgctgctggcgccgtcttactttccgtatgccagcagcag
gaagacatctccgaccacgcgctgcgttcctgaccgacttccatggtctggtgcgttctagctgcgttatcttccg
cctgtgcaacgatctggccacctctgcggcggagctggaacgtggcgagctaccaattctatcattagctacatgc
acgaaaacgatggtaccagcgaggaacaggcccgcgaagaactgcgtaaactgatcgacgccgaatggaaaaagatg
aatcgtgaacgcgttagcgactccaccctgctgcctaaagcgttcatggaaatcgcagttaacatggcacgtgtttc
ccactgcacctaccagtatggcgatggtctgggtcgcccagactacgcgactgaaaaccgcatcaaactgctgctga
ttgaccctttcccgattaaccagctgatgtatgtctaactgcagggatccgtcgaccg

(SEQ ID NO:113)

Fig. 137O

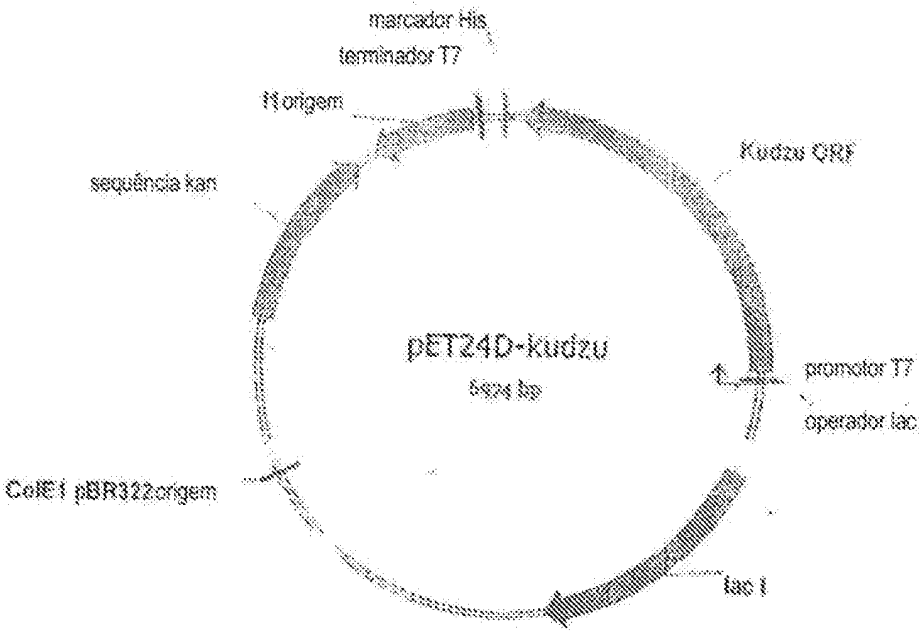

marcador His
terminador T7
f1 origem
Kudzu ORF
sequência kan
pET24D-kudzu
promotor T7
operador lac
ColE1 pBR322origem
lac I

Fig. 137P

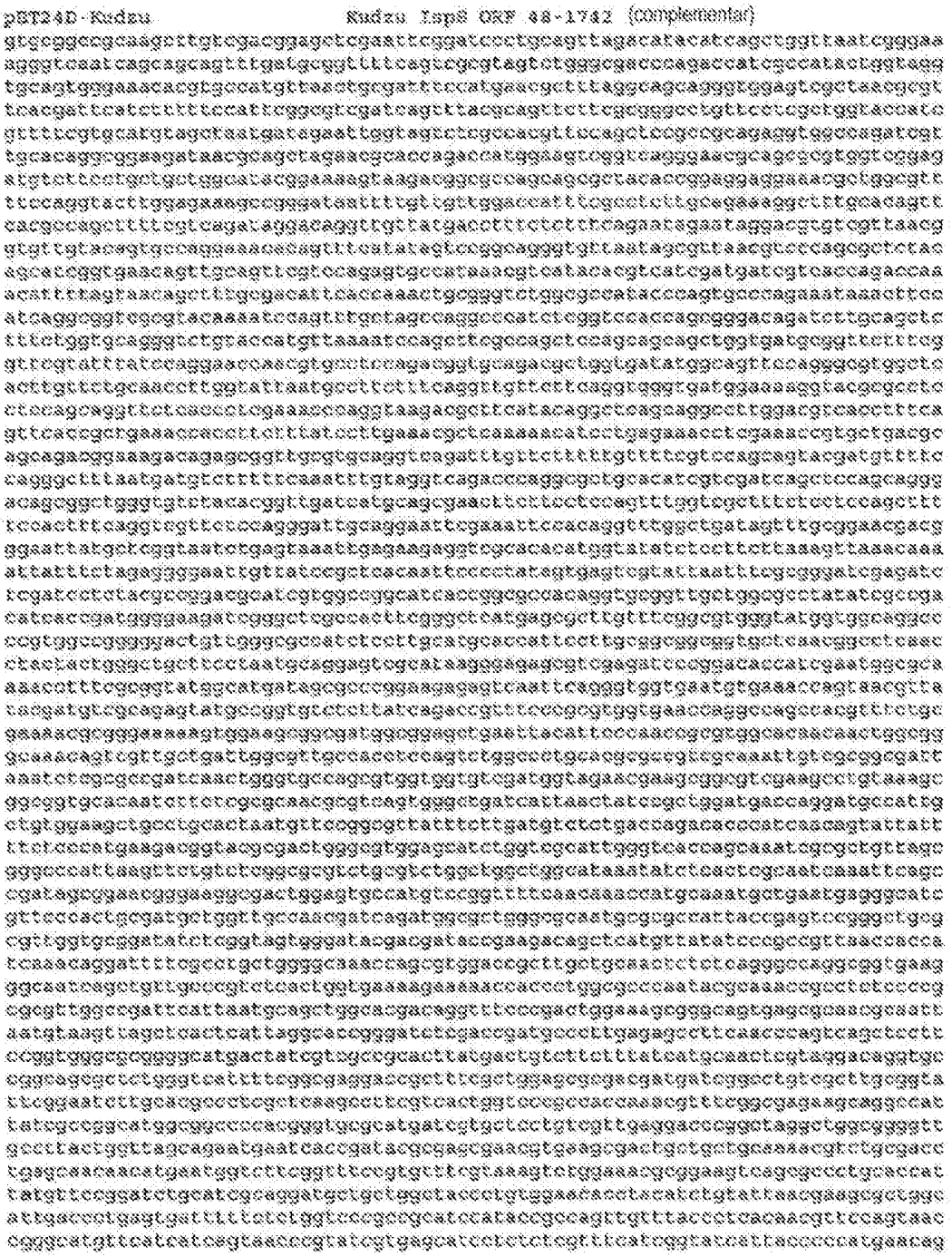


Fig. 137Q

aaatccccccttacacggaggcatcagtgaccaaacaggaaaaaaccgccccttaacatggcccgctttatcagaagcc
agacattaacgcttctggagaaactcaacgagctggacgcggatgaacaggcagacatctgtgaatcgcttcacgac
cacgctgatgagctttaccgcagctgcctcgcgcgtttcggtgatgacggtgaaaacctctgacacatgcagctccc
ggagacggtcacagcttgtctgtaagcggatgccgggagcagacaagcccgtcagggcgcgtcagcgggtgttggcg
ggtgtcgggcgcagccatgacccagtcacgtagcgatagcggagtgtatactggcttaactatgcggcatcagagc
agattgtactgagagtgcaccatatatgcggtgtgaaataccgcacagatgcgtaaggagaaaataccgcatcaggc
gctcttccgcttcctcgctcactgactcgctgcgctcggtcgttcggctgcggcgagcggtatcagctcactcaaag
gcggtaatacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccag
gaaccgtaaaaaggccgcgttgctggcgtttttccataggctccgcccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgct
caagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataaagataccaggcgtttccccctggaagctccctcgtgcgctct
cctgttccgaccctgccgcttaccggatacctgtccgcctttctcccttcgggaagcgtggcgctttctcatagctc
acgctgtaggtatctcagttcggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaaccccccgttcagcccg
accgctgcgccttatccggtaactatcgtcttgagtccaacccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagcc
actggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcggtgctacagagttcttgaagtggtggcctaactacggcta
cactagaaggacagtatttggtatctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgat
ccggcaaacaaaccaccgctggtagcggtggtttttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatct
caagaagatcctttgatcttttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggattttggtcat
gaacaataaaactgtctgcttacataaacagtaatacaaggggtgttatgagccatattcaacgggaaacgtcttgc
tctaggccgcgattaaattccaacatggatgctgatttatatgggtataaatgggctcgcgataatgtcgggcaatc
aggtgcgacaatctatcgattgtatgggaagcccgatgcgccagagttgtttctgaaacatggcaaaggtagcgttg
ccaatgatgttacagatgagatggtcagactaaactggctgacggaatttatgcctcttccgaccatcaagcatttt
atccgtactcctgatgatgcatggttactcaccactgcgatccccgggaaaacagcattccaggtattagaagaata
tcctgattcaggtgaaaatattgttgatgcgctggcagtgttcctgcggccggttgcattcgattcctgtttgtaatt
gtccttttaacagcgatcgcgtatttcgtctcgctcaggcgcaatcacgaatgaataacggtttggttgatgcgagt
gatttgatgaccgagcgtaatggctggcctgttgaacaagtctggaaagaaatgcataaacttttgccattctcaccg
gaattcagtcgtcactcatggtgatttctcacttgataaccttatttttgacgaggggaaattaataggttgtattg
atgttggacgagtcggaatcgcagaccgataccaggatcttgccatcctatggaactgcctcggtgagttttctcct
tcattacagaaacggctttttcaaaaatatggtattgataatcctgatatgaataaattgcagtttcatttgatgct
cgatgagtttttctaagaattaattcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataaacaaatagggggtt
ccgcgcacatttccccgaaaagtgccacctgaaattgtaaacgttaatatttttgttaaaattcgcgttaaatttttg
ttaaatcagctcatttttaaccaataggccgaaatcggcaaaatcccttataaatcaaaagaatagaccgagatagg
gttgagtgttgttccagtttggaacaagagtccactattaaagaacgtggactccaacgtcaaagggcgaaaaacc
gtctatcagggcgatggcccactacgtgaaccatcacccta atcaagttttttggggtcgaggtgccgtaaagcact
aaatcggaaccctaaagggagcccccgatttagagcttgacggggaaagccggcgaacgtggcgagaaaggaagggа
agaaagcgaaaggagcgggcgctagggcgctggcaagtgtagcggtcacgctgcgcgtaaccaccacacccgccgcg
cttaatgcgccgctacagggcgcgtcccattcgccaatccggatatagttcctcctttcagcaaaaaacccctcaag
acccgtttagaggccccaaggggttatgctagttattgctcagcggtggcagcagccaactcagcttcctttcgggc
tttgttagcagccggatctcagtggtggtggtggtggtgctcga

(SEQ ID NO:114)

Fig. 138

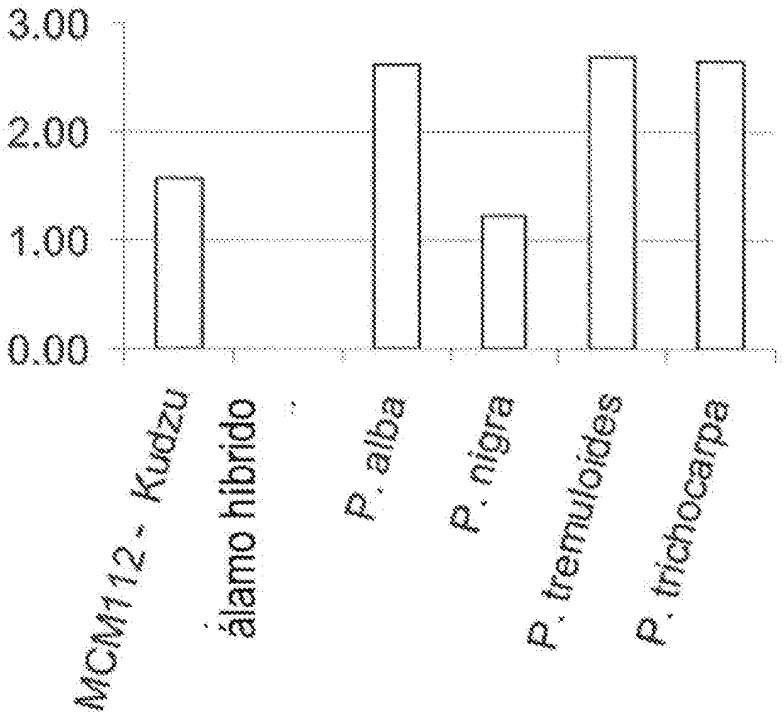

3.00
2.00
1.00
0.00
MCM112 - Kudzu
álamo híbrido
P. alba
P. nigra
P. tremuloides
P. trichocarpa

Fig. 139

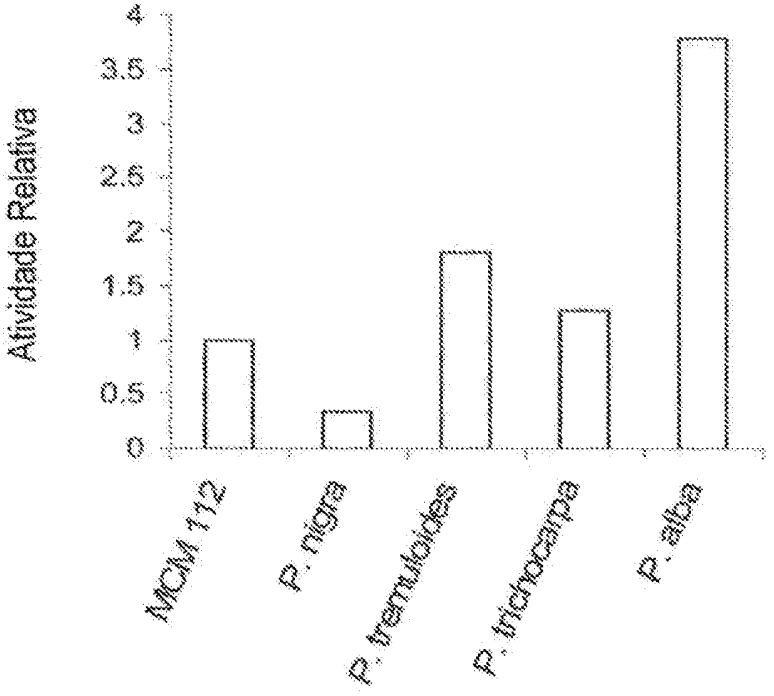

Atividade Relativa
0
0,5
1
1,5
2
2,5
3
3,5
4
MCM 112
P. nigra
P. tremuloides
P. trichocarpa
P. alba

Fig. 140

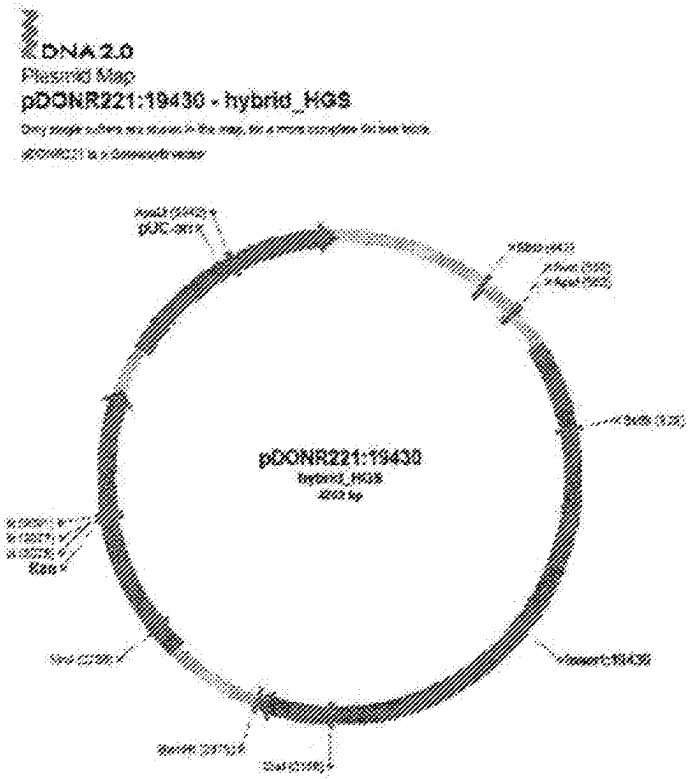

DNA 2.0
Plasmid Map
pDONR221:19430 - hybrid_HGS
pDONR221:19438
hybrid_HGS

Fig. 141

gaattcaaaatgtgtgcaacttcatcccaattcactcaaatcacagagcataattctagacgttcagctaactaccaaccaa
atctgtggaatttgaatttcttcaatcccttgaaaatgatttgaaagtggaaaagttggaggaaaaagccacaaaactaga
ggaagaagttagatgtatgataaacagagtagatacacaacctctgtcactactagaattgattgacgatgtccagaggct
gggtttaacatataagttcgaaaaggatataatcaaagccttagaaaacatagtccttctagatgaaaacaagaagaata
agtctgacttgcacgcaaccgctctgagttttagattgctgagacaacatggttttgaagtaagtcaagatgtgttttgaaaggtt
caaagacaaagagggaggattctcaggagaattaaagggagatgtgcagggtctgttgtcattgtacgaggccagttattt
ggggttgaaggggaaaatctactagaggaggccagaaccttctctataacccatctgaagaataacttgaaagaaggc
atcaatacaaaagtggctgaacaagttcacatgcattggaattgccctaccaccaaagacttcatagacttgaagccaga
tggttttggacaagtatgaaccaaaggagcctcaccatcaacttttattggaattagcaaaactggatttaacatggttcag
acattacaccagaaagaattgcaggacctatcaagatggtggacggagatgggttagccagcaagttagatttcgttaga
gatagattgatggaagtttacttttgggcactgggaatggcaccagatcctcaatttggtgaatgtagaaaggcagttacaa
agatgttggtctagtaacaatcattgatgatgttatgatgtgtacggaacttggatgaattacaactattcaccgacgcagtt
gaacgttgggatgtaaacgcaataaacacgttgcctgattatatgaagctgtgttttctggcattgtacaacacagtcaatga
cacttcttactccatttaaaggagaaagggcataacaatctatcctatttgacaaaatcatggagggagttatgcaaagcat
tccttcaagaagctaagtggtctaacaataagataatcccagcattctccaagtatcttgaaaacgcttcgtatcctcctccg
gtgtggcctactagcaccatcatatttttccgtctgccagcagcaggaagatatctctgatcatgcttgagatccttaacag
attttcatggtctagtcagatcctcttgcgtgattttcagattgtgcaatgatttggctacttcagccgcagagttagaggggt
gaaaccacgaactcaattattagttatatgcacgagaatgatggaacatccgaagaacaagcccgtgaagaattaagaa
aactgatcgatgctgaatggaagaagatgaatagagaaagagtttccgacagcactttgctgcctaaggcattcatggag
atagctgttaacatggctagggtttcacactgtacataccaatacgggacggtcttggaaggcccgactacgccactgaa
aatagaattaaactgctactgattgatcctttccccattaaccagttaatgtacgtgtaatagggatccgaattc

(SEQ ID NO:115)

Fig. 142A

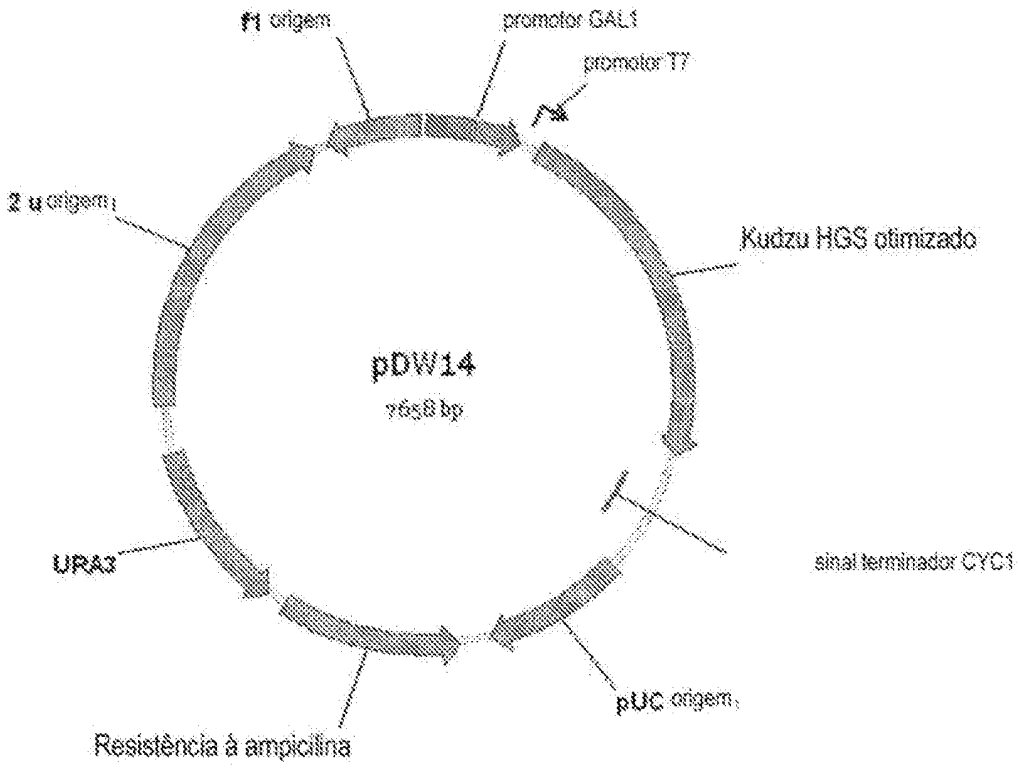

f1 origem
promotor GAL1
promotor T7
2 u origem
Kudzu HGS otimizado
pDW14
9685 bp
URA3
sinal terminador CYC1
pUC origem
Resistência à ampicilina

Fig. 142B

acggattagaagccgccgagcgggtgacagccctccgaaggaagactctcctccgtgcgtcctcgtcttcaccggtcgcg
ttcctgaaacgcagatgtgcctgcgccgcactgctccgaacaataaagattctacaatactagcttttatggttatgaagag
gaaaaattggcagtaacctggccccacaaaccttcaaatgaacgaatcaaattaacaaccataggatgataatgcgattа
gttttttagccttatttctggggtaattaatcagcgaagcgatgatttttgatctattaacagatatataaatgcaaaaactgcata
accacttaactaatacttcaacattttcgggtttgtattacttcttatcaaatgtaataaagtatcaacaaaaaattgttaatata
cctctatacttaacgtcaaggagaaaaaaccccggatcggactactagcagctgtaatacgactcactatagggaatatt
aagctatcaaacaagtttgtacaaaaaagcaggctgaattcaaaatgtgtgcaacttcatcccaatttcactcaaatcacag
agcataattctagaccgttcagctaactccaaccaaatctgtggaatttgaatttcttcaatccttgaaaatgatttgaaagt
cgaaaagtcgaggaaaaaagccacaaaactagaggaagaagttagatgtatgataaacagaagtagatacacaaccttc
tgtcactactagaattgatttgaccgatatccagaggctgggtttaacatataagttcgaaaaggatataatcaaaagccttacgaa
aacatagtccttctagatgaaaacaagaagaagataagtctgacttgccacgccaaccgcttctgagtttttagattgcttgagacaaac
atggttttgaaatcaagtcaagatatgttgaaaagttcaaagacaaagaaccgaccgaatttcaggagaaattaaagccgaagat
atgcagggtcttattcattgtacgaggccagttatttggcgtttgaaggcgaaaatctactagaggaggccagaaccttctc
tataaccatctgaagaataacttgaaaagaaggcatcaatacaaaagtggctgaacaagtttcacatgcattggaatttgcc
ctaccaccaaagacttcatagacttgaagccagatggttttttgcacaacatgaaccaaaggaggctcaccatcaacttta
ttggaattagcaaaactggatttaacatgttcagacattacccgaaagaaattgcaggacctatcaagatggtgacct
gaatgcgtttagccagcaagttagattcttagagatagattcatcgaacttacttttgccacctcggaatggcaccaga
tcctcaatttcctgaatctagaaagccagttacaaaagatgttggtctagtaacaatcattgatgatgtttatgatgtgtacggа
acttggatgaattacaactattcaccgacccagttgaacgtggatctaaacgcaataaacacgttgcctgattatatcgaa
gctgtctttctggcattgtacaacacagtcaatgacacttcttactccatttaaaggacgaaagggcgtaacaatctatcctatt
tgacaaaatcatggagggagttatgcaaagcattcttcaagaagctaagtggtctaacaataagataatcccagcattct
ccaagtatctttgaaaacgctccgtatcctctccgtgtgcccctactagcaccatctatttttccatctgccagcagcagg
aagatatctctgatcatgcttttgagatccttaacagattttcatgctctagtcgatcctcttgcgtgattttcagattgtgcaatgga
tttgctacttcagcccagagttagagaccgtgaaaccaccaactcaattattagttatatgcacgacaatgatggaac
atccgaagaacaagccgtcgaagaattaagaaaactgatcgatgctgaatgaagaagatgaatagagaaaagagtttc
cgacagcacttgctgcctaaagcattcatgagatagctgttaacatggtaggtttcacactgtacataccaatacggg
gacggtcttcgaaggcccgactacgccactgaagaatagaattaaactgctactgattgatccttcccccattaaccagttaat
atacctgtaaatagggatccgaattcacccagcttcttgtacaaagtggttcgatctagagggcccttcgaaggtaagcctat
ccctaaccctctcctcggtctcgattctacgcgtaccggtcatcatcaccatcaccattgagtttaaaccccgctgatcctagag
ggccgcatcatgtaattagttatgtcacgcttacattcacgccctccccccacatccgctctaaccgaaaaggaaggagttа
gacaacctgaagtctaggtcccttattatttttttatagttatgttagtattaagaacgttatttatatttcaaatttttctttttttctgtac
agacgcgtgtacgcatgtaacattatactgaaaaccttgcttgagaaggtttgggacgctcgaaggctttaatttgcaagct
gcggccctgcattaatgaatcggccaacgcgcggggagaggcggtttgcgtattgggcgctcttccgcttcctcgctcactg
actcgctgcgctcggtcgttcggctgcggcgagcggtatcagctcactcaaaggcggtaatacggttatccacagaatcag
gggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaagcccaggaaccgtaaaaaggccgcgttgctgg
cgtttttccataggctccgcccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaacccgacagg
actataaagataccaggcgtttccccctggaagctccctcgtgcgctctcctgttccgaccctgccgcttaccggatacctgt
ccgcctttctcccttcgggaagcgtggcgctttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcggtgtaggtcgttcgctccaa
gctgggctgtgtgcacgaaccccccgttcagcccgaccgctgcgccttatccggtaactatcgtcttgagtccaaccggta
agacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcggtgctacagagt
tcttgaagtggtggcctaactacggctacactagaaggacagtatttggtatctgcgctctgctgaagccagttaccttcgga
aaaagagttggtagctcttgatccggcaaacaaaccaccgctggtagcggtggtttttttgtttgcaagcagcagattacgcg
cagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagg
gattttggtcatgagattatcaaaaggatcttcacctagatccttttaaattaaaaatgaagttttaaatcaatctaaagtatat
atgagtaaacttggtctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgatctgtctatttcgttcatccatagtt
gcctgactccccgtcgtgtagataactacgatacgggagcgcttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgaga
cccacgctcaccggctccagatt

Fig. 142C

tatcagcaataaaccagccagccggaagggccgagcgcagaagtggtcctgcaactttatccgcctccatccagtctattaattg
ttgccgggaagctagagtaagtagttcgccagttaatagtttgcgcaacgttgttggcattgctacaggcatcgtggtgtcactctcg
tcgtttggtatggcttcattcagctccggttcccaacgatcaaggcgagttacatgatcccccatgttgtgcaaaaaagcggttagct
ccttcggtcctccgatcgttgtcagaagtaagttggccgcagtgttatcactcatggttatggcagcactgcataattctcttactgtca
tgccatccgtaagatgcttttctgtgactggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgtatgcggcgaccgagttgctcttgc
ccggcgtcaatacgggataatagtgtatcacatagcagaacttaaaagtgctcatcattggaaaacgttcttcggggcgaaaaac
tctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcgatgtaacccactcgtgcacccaactgatcttcagcatcttttactttcaccagc
gtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaaagggaataagggcgacacggaaatgttgaatactcata
ctcttcctttttcaatgggtaataactgatataattaaattgaagctctaatttgtgagtttagtatacatgcatttacttataatacagttttt
agttttgctggccgcatcttctcaaatatgcttcccagcctgcttttctgtaacgttcaccctctaccttagcatcccttccctttgcaaata
gtcctcttccaacaataataatgtcagatcctgtagagaccacatcatccacggttctatactgttgacccaatgcgtctcccttgtca
tctaaacccacaccgggtgtcataatcaaccaatcgtaaccttcatctcttccaccccatgtctcttgagcaataaagccgataaca
aaatcttttgtcgctcttcgcaatgtcaacagtacccttagtatattctccagtagataggggagcccttgcatgacaattctgctaacat
caaaaggcctctaggttcctttgttacttctttctgccgcctgcttcaaaccgctaacaatacctgggcccaccacacgtgtgcattc
gtaatgtctgcccattctgctatttcgtgtatacacccgcagagtactgcaatttgactgtattaccaatgtcagcaaatttttctgtcttcga
agagttaaaaaaattgtacttggcggataatgccttagcggcttaactgtgccctccatggaaaaatcagtcaagatatccacatgt
gttttagtaaaacaaatttttgggacctaatgcttcaactaactccagtaatttcttgggtgtacgaacatccaatgaagcacacaagt
ttgtttgctttcgtgcatgatattaaatagcttggcgacgacaggactaggatgagtagcagcacgttccttatatgtagcttcgaca
tgatttatcttcgtttcctgcaggttttgttctgtgcagttgggttaagaatactgggcaatttcatgtttcttcaacactacatatgcgtata
tataccaatctaagtctgtgctccttccttcgtttcttccttctgttcggagattaccgaatcaaaaaaatttcaaagaaaccgaaatca
aaaaaaagaatatcaaaaaaaaaaatgatgaattgaattgaaaagctagcttatcgatgataagctgtcaaagatgagaattaattcc
acggactatagactatactagatactccgtctactgtacgatacacttccgctcaggtccttgttcctttaacgaggccttaccactctt
tgttactctattgatccagctcagcaaaggcagtgtgatctaagattctatctttcgcgatgtagtaaaactagctagaccgagaaag
agactagaaatgcaaaaggcacttctacaatggctgccatcattattatccgatgtgacgctgcagcttctcaatgatattcgaata
cgcttgaggagatacagcctaatatccgacaaactgtttttacagattacgatcgtacttgttacccatcattgaatttttgaaacatccg
aacctgggagtttccctgaaacagatagtatattgaacctgtataatattatatagtctagcgctttacggaagacaatgtatgtat
ttcggttcctggagaaactattgcatctattgcataggtaatcttgcacgtcgcatcccggttcatttctgcgtttccatcttgcacttca
atagcatatcttttgttaacgaagcatctgtgcttcattttgtagaacaaaaatgcaacgcgagagcgctaatttttcaaacaaagaat
ctgagctgcattttttacagaacagaaatgcaacgcgaaagcgctatttttaccaacgaagaatctgtgcttcatttttgtaaaacaaa
aatgcaacgcgacgagagcgctaatttttcaaacaaagaatctgagctgcatttttacagaacagaaatgcaacgcgagagcg
ctatttttaccaacaaagaatctatacttcttttttgttctacaaaaatgcatcccgagagcgctatttttctaacaaagcatcttagattac
ttttttttctccttttgtgcgctctataatgcagtctcttgataactttttgcactgtaggtccgttaaggttagaagaaggctacttttggtgtcta
ttttctcttccataaaaaaaagcctgactccacttcccgcgtttactgattactagcgaagctgcgggtgcatttttcaagataaaggcc
atcccgattatattctatacccgatgtggattgcgcatactttgtgaacagaaagtgatagcgttgatgattcttcattggtcagaaaat
tatgaacggtttcttctatttttgtctctatatactacgtatagggaaatgtttacatttcgtattgtttttcgattcactctatgaatagttcttacta
caatttttttgtctaaagagtaatactagagataaacataaaaaatgtagaggtcgagtttagatgcaagttcaaggagcgaaaag
gtggatgggtaggttatatagggatatagcacagagatatatagcaaagagatacttttgagcaatgtttgtggaagcggtattcg
caatgggaagctccacccggttgataatcagaaaagcccaaaaaacaggaagattgtataagcaaatatttaaattgtaaac
gttaatattttgttaaaattcgcgttaaatttttgttaaatcagctcatttttaacgaatagccgaaatcggcaaaatcccttataaatc
aaaagaatagaccgagatagggttgagtgttgttccagtttccaacaagagtccactattaaagaacgtggactccaacgtcaa
agggcgaaaaagggtctatcagggcgatggcccactacgtgaaccatcaccctaatcaagttttttggggtcgaggtgccgtaa
agcactaaatcggaagggtaaaaggatgcccccatttagagcttgacggggaaagccggcgaacgtggcgagaaaggaag
ggaagaaagcgaaaggagcgggggctagggcggtgggaagtgtagggtcacgctgggcgtaaccaccacaccgccg
cgcttaatgggggcgctacagggcgcgtgggatgatccactagt

(SEQ ID NO:119)

Fig. 143

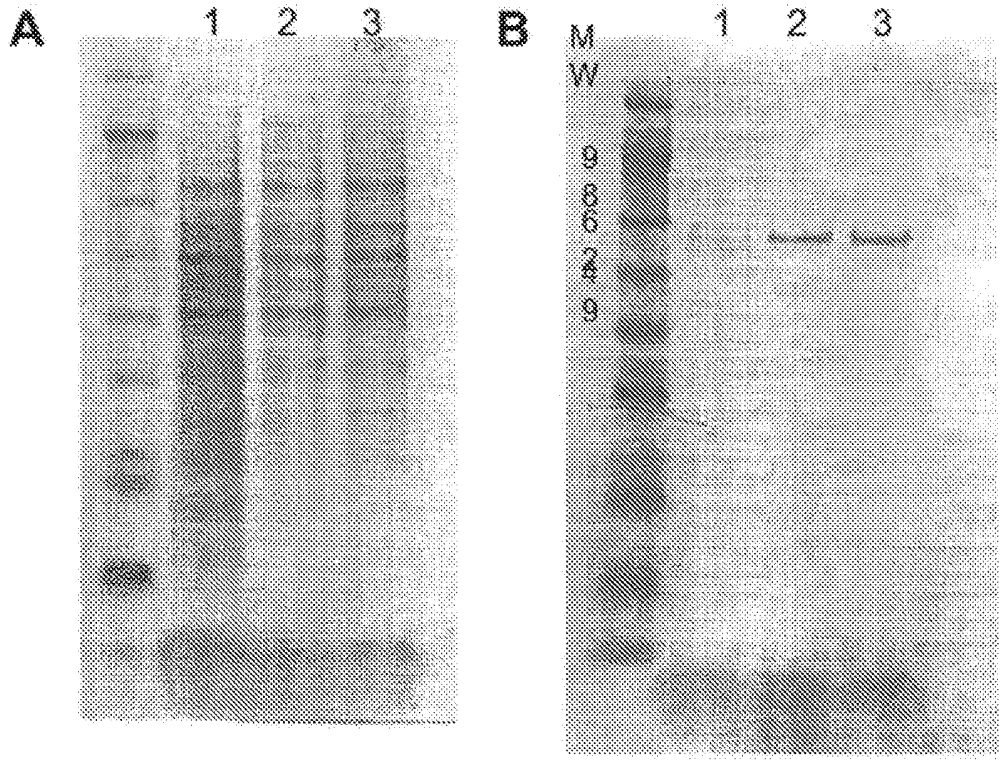
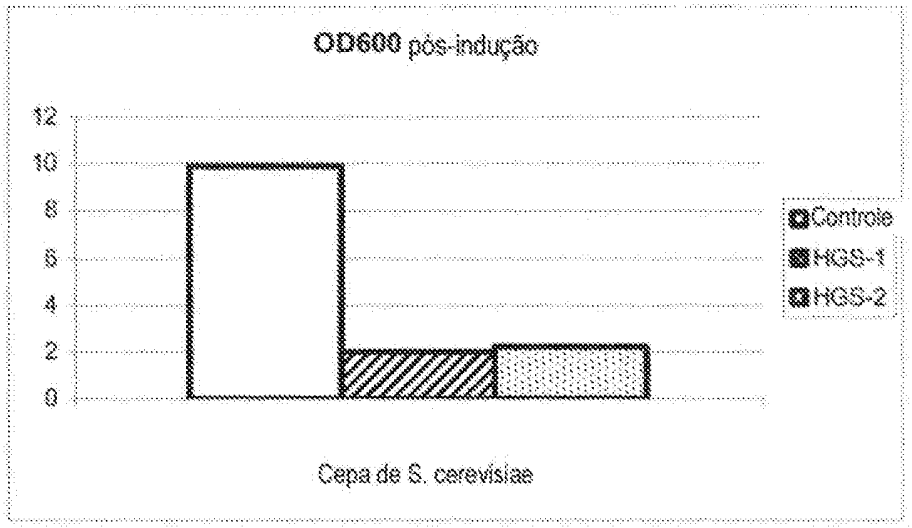


Fig. 144

A


OD600 pós-indução
12
10
8
6
4
2
0
Controle
HGS-1
HGS-2
Cepa de S. cerevisiae

B

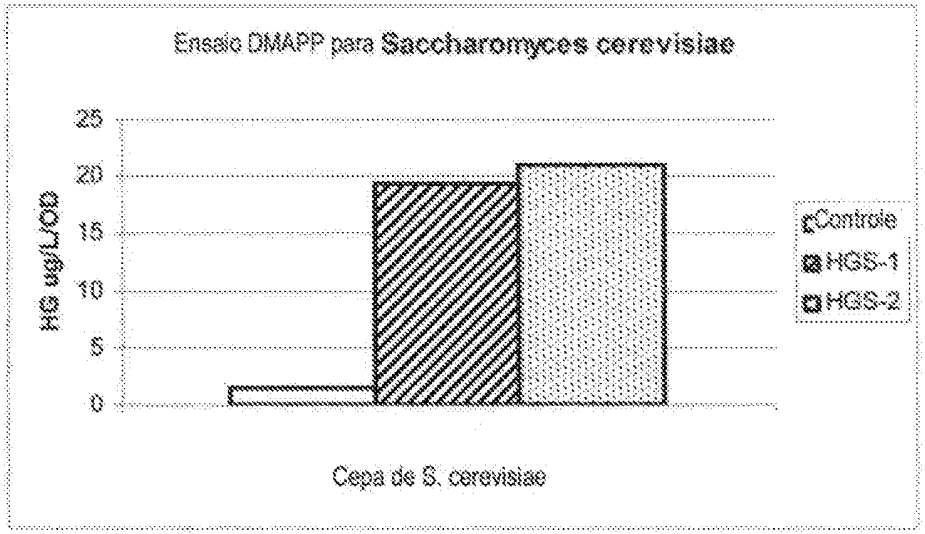

Ensaio DMAPP para Saccharomyces cerevisiae
HG ug/L/OD
25
20
15
10
5
0
Controle
HGS-1
HGS-2
Cepa de S. cerevisiae

Fig. 145A

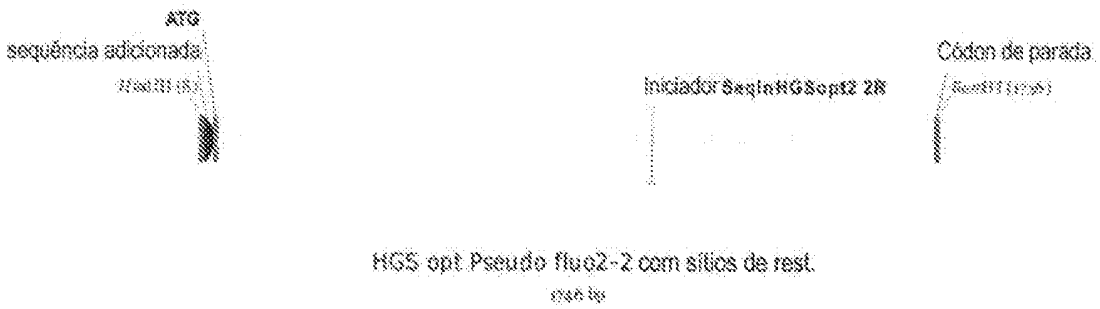

ATG
sequência adicionada
Iniciador SeqIaHGSopt2 28
Códon de parada
HGS opt Pseudo fluo2-2 com sítios de rest.

Fig. 145B

catcttaagctgtttaacttaagaaggagatatacatatgtgcgccaccagcagccagttcaccccgatcaccgagcat
aatagccgtcggtccgcgaaactaccagcccaacctgtggaacttcgagttcctgcagagcctggaaaacgacctgaag
gtggagaagctcgaagagaaggccaccaagctggaggaggaggtgcgttgcatgatcaaccgggtggacacccag
cccctgagcctgctggagctcatcgacgacgtgcagcgcctgggcctgacctacaagtttgagaaaagatatcatcaag
gcgctggagaacatcgtcctgctggacgagaataagaagaacaaaagcgatctgcacgcgaccgccctgagcttcc
gcctgctgcggcagcatggcttgaggtgagccaggacgtgttcgagcgcttcaaggacaaagaaggggctttctccg
gggaactgaagggtgacgtgcagggcctgctgagcctgtacgaggccagctatctcggtttcgaaggcgaaaatctgct
ggaggaggcccgtaccttcagcatcaccatctgaagaacaacctcaaggaggggatcaacacgaaggtggccga
gcaggtgtcccacgcgctggagctgccgtatcatcaacgcctgcaccgcctggaggcgcggtggtttctggacaagtac
gaacccaaggagccgcatcaccagctgctgctggaactggccaaactcgatttcaacatggtccagaccctgcacca
aaaagagctgcaggacctgagccggtggtggaccgagatgggcctcgccagcaagctggatttcgtgcgggaccgc
ctgatggaagtgtacttctgggcgctgggcatggcgccggacccgcagttcggcgaatgccgcaaggccgtcaccaa
gatgttcggtctggtcaccattatcgatgacgtctatgacgtgtacggtaccctggacgaaatgcagctctttcaccgagcc
ggtggaacgctgggacgtgaacgccatcaacacgctgccgactatatgaagctgtgcttcctggccctgtacaacacc
gtgaacgacacgtcctactccatcctgaaggagaagggccacaataacctgagctatctgaccaaaagctggcgcga
actgtgcaaggccttcctgcaagaagccaagtggagcaataacaagatcatcccgcttcagcaagtacctggaga
acgccagcgtgtcctccagcgggtgcgctgctggcgccgagctacttctcggtctgccagcagcaggaagatatctc
ggaccacgccctccgctccctgaccgacttccacggcctggtgcgctcgtcctgcgtgatctttcggctgtgcaacgatct
ggcgacctcggcggcggaactgaacgcggcgaaaccaccaacagcatcatcagctacatgcacgagaaacgacg
gcacgaggcgaggaacaggcccgcgaagagctgcgcaagctgatgacgccgagtggaagaaaatgaaccgcga
gcgcgtgtcggacagcaccctgctgccgaaggcgttcatggagatcgccgtgaacatggcccgcgtgagccactgca
cctaccaatatgggacgggctgggcgcccggattacgacaccgagaaccgcatcaagctgctgctcatcgacccg
ttcccatcaaccagctgatgtacgtgtgaggatcccgtaac

(SEQ ID NO:120)

Fig. 146A

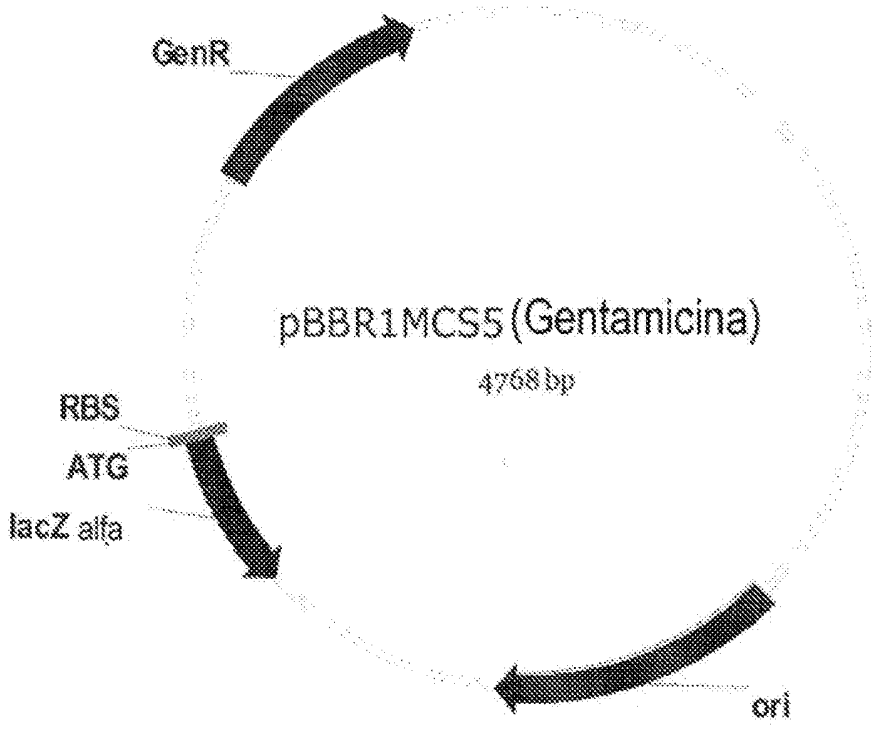


Fig. 146B

ctcgggccgtctcttgggcttgatcggccttcttgcgcatctcacgcgctcctgcggcggcctgtagggcaggctcatacccctgcc
gaaccgctttttgtcagccggtcggccacggcttccggcgtctcaacgcgctttgagattcccagcttttcggccaatccctgcggtg
cataggcgcgtggctcgaccgcttgcgggctgatggtgacgtggcccactggtggccgctccagggcctcgtagaacgcctga
atgcgcgtgtgacgtgccttgctgccctcgatgccccgttgcagccctagatcggccacagcggccgcaaacgtggtctggtcg
cgggtcatctgcgctttgttgccgatgaactccttggccgacagcctgccgtcctgcgtcagcggcaccacgaacgcggtcatgt
gcggggctggtttcgtcacggtggatgctggccgtcacgatgcgatccgccccgtacttgtccgccagccacttgtgcgccttctcg
aagaacgccgcctgctgttcttggctggccgacttccaccattccgggctggccgtcatgacgtactcgaccgccaacacagcgt
ccttgcgccgcttctctggcagcaactcgcgcagtcggcccatcgcttcatcggtgctgctggccgcccagtgctcgttctctggcg
tcctgctggcgtcagcgttgggcgtctcgcgctcgcggtaggcgtgcttgagactggccgccacgttgcccattttcgccagcttctt
gcatcgcatgatcgcgtatgccgccatgcctgcccctccctttggtgtccaaccggctcgacgggggcagcgcaaggcggtgc
ctccggcgggccactcaatgcttgagtatactcactagactttgcttcgcaaagtcgtgaccgcctacggcggctgcggcgccct
acgggcttgctctccgggcttcgccctgcgcggtcgctgcgctcccttgccagcccgtggatatgtggacgatggccgcgagcg
gccaccggctggctcgcttcgctcggcccgtggacaaccctgctggacaagctgatggacaggctgcgcctgcccacgagctt
gaccacagggattgcccaccggctacccagccttcgaccacatacccaccggctccaactgcgcggcctgcggccttgcccc
atcaattttttaatttctctggggaaaagcctccggcctgcggcctgcgcgcttcgcttgccggttggacaccaagtggaaggcg
ggtcaaggctcgcgcagcgaccgcgcagcggcttggccttgacgcgcctggaacgacccaagcctatgcgagtgggggcag
tcgaaggcgaagcccgcccgcctgccccccgagcctcacggcggcgagtgcgggggttccaagggggcagcgccaccttg
ggcaaggccgaaggccgcgcagtcgatcaacaagccccggaggggccactttttgccggagggggagccgcgccgaagg
cgtgggggaaccccgcagggggtgcccttctttgggcaccaaagaactagatatagggcgaaatgcgaaagacttaaaaatca
acaacttaaaaaagggggtacgcaacagctcattgcggcacccccgcaatagctcattgcgtaggttaaagaaaatctgta
attgactgccactttacgcaacgcataattgttgtcgcgctgccgaaaagttgcagctgattgcgcatggtgccgcaaccgtgcg
gcaccctaccgcatggagataagcatggccacgcagtccagagaaatcggcattcaagccaagaacaagcccggtcactgg
gtgcaaacggaacgcaaagcgcatgaggcgtgggccgggcttattgcgaggaaacccacggcggcaatgctgctgcatcac
ctcgtggcgcagatgggccaccagaacgccgtggtggtcagccagaagacactttccaagctcatcggacgttctttgcggacg
gtccaatacgcagtcaaggacttggtggccgagcgctggatctccgtcgtgaagctcaacggccccggcaccgtgtcggccta
cgtggtcaatgaccgcgtggcgtggggccagccccgcgaccagttgcgcctgtcggtgttcagtgccgccgtggtggttgatcac
gacgaccaggacgaatcgctgttggggcatggcgacctggcgccgcatcccgaccctgtatccgggcgagcagcaactaccg
accggccccggcgaggagccgcccagccagcccggcattccgggcatggaaccagacctgccagccttgaccgaaacgg
aggaatgggaacggcgcgggcagcagcgcctgccgatgcccgatgagccgtgtttttctggacgatggcgagccgttggagcc
gccgacacgggtcacgctgccgcgccggtagcacttgggttgcgcagcaacccgtaagtgcgctgttccagactatcggctgta
gccgcctcgccgccctataccttgtctgcctccccgcgttgcgtcgcggtgcatggagccgggccacctcgacctgaatggaag
ccggcggcacctcgctaacggattcaccgtttttatcaggctctgggaggcagaataaatgatcatatcgtcaattattacctccac
ggggagagcctgagcaaactggcctcaggcatttgagaagcacacggtcacactgcttccggtagtcaataaaccggtaaac
cagcaatagacataagcggctatttaacgaccctgccctgaaccgacgacgggtcgaatttgctttcgaatttctgccattcatcc
gcttattatcacttattcaggcgtagcaccaggcgtttaagggcaccaataactgccttaaaaaaattacgccccgccctgccact
catcgcagtcggcctattggttaaaaaatgagctgatttaacaaaaatttaacgcgaattttaacaaaatattaacgcttacaattc
cattcgccattcaggctgcgcaactgttgggaagggcgatcggtgcgggcctcttcgctattacgccagctggcgaaagggggga
tgtgctgcaaggcgattaagttgggtaacgccagggttttcccagtcacgacgttgtaaaacgacggccagtgagcgcgcgtaa
tacgactcactatagggcgaattggagctccaccgcggtggcggccgctctagaactagtggatcccccgggctgcaggaattc
gatatcaagcttatcgataccgtcgacctcgagggggggcccggtacccagcttttgttccctttagtgagggttaattgcgcgcttg
gcgtaatcatggtcatagctgtttcctgtgtgaaattgttatccgctcacaattccacacaacatacgagccggaagcataaagtgt
aaagcctggggtgcctaatgagtgagctaactcacattaattgcgttgcgctcactgcccgctttccagtcgggaaacctgtcgtg
ccagctgcattaatgaatcggccaacgcgcggggagaggcggtttgcgtattgggcgcatgcataaaaactgttgtaattcatta
agcattctgccgacatggaagccatcacaaacggcatgatgaacctgaatcgccagcggcatcagcac

Fig. 146C

cttgtcgccttgcgtataatatttgcccatggacgcaccgtggaaacggatgaaggcacgaacccagttgacataa
gcctgttcggttcgtaaactgtaatgcaagtagcgtatgcgctcacgcaactggtccagaacctgaccgaacgcagc
ggtggtaacggcgcagtggcggttttcatggcttgttatgactgttttttgtacagtctatgcctcgggcatccaagcagca
agcgcgttacgccgtgggtcgatgtttgatgttatggagcagcaacgatgttacgcagcagcaacgatgttacgcagc
agggcagtcgccctaaaacaaagttaggtggctcaagtatgggcatcattcgcacatgtaggctcggcctgaccaa
gtcaaatccatgcgggctgctcttgatcttttcggtcgtgagttcggagacgtagccacctactcccaacatcagccgga
ctccgattacctcgggaacttgctccgtagtaagacattcatcgcgcttgctgccttcgaccaagaagcggttgttggcg
ctctcgcggcttacgttctgcccaggtttgagcagccgcgtagtgagatctatatctatgatctcgcagtcttcggcgagc
accggaggcagggcattgccaccgcgctcatcaatctcctcaagcatgaggccaacgcgcttggtgcttatgtgatct
acgtgcaagcagattacggtgacgatccccgcagtggctctctatacaaagttgggcatacgggaagaagtgatgcac
tttgatatcgacccaagtaccgccacctaacaattcgttcaagccgagatcggcttcccggccgcggagttgttcggta
aattgtcacaacgccgccaggtggcacttttcggggaaatgtgcgcgccccgcgttcctgctggcgctgggcctgtttctg
gcgctggacttcccgctgttccgtcagcagctttcgccccacggccttgatgatcgcggcggccttggcctgcatatcccg
attcaacggcccccagggcgtccagaacgggcttcaggcgctcccgaaggt

(SEQ ID NO:121)

Fig. 147A

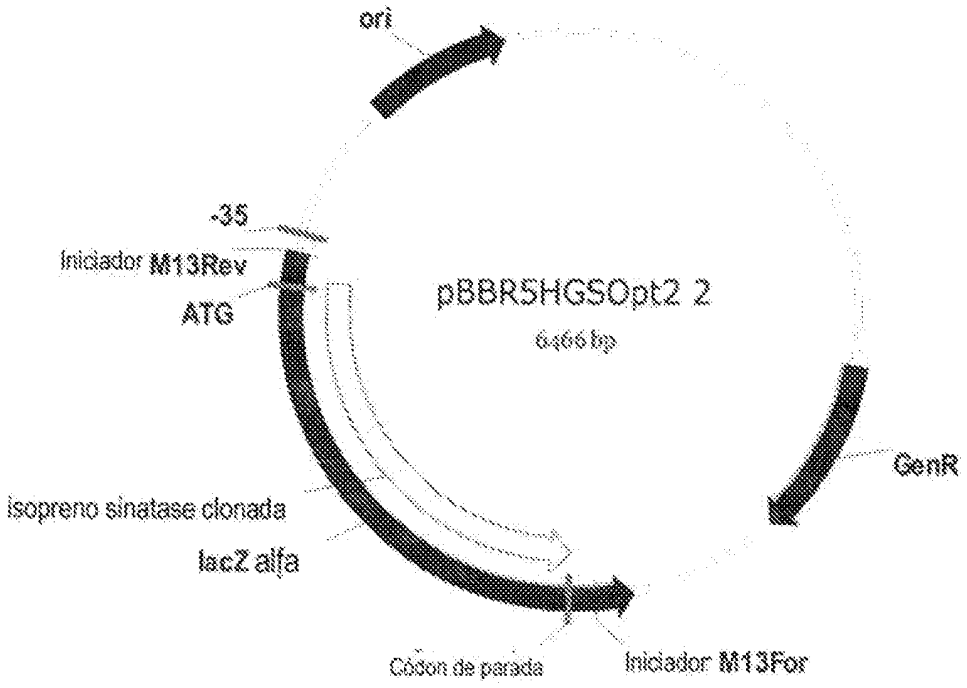

ori
-35
Iniciador M13Rev
ATG
pBBR5HGSOpt2 2
6466 bp
GenR
isopreno sinatase clonada
lacZ alfa
Códon de parada
Iniciador M13For

Fig. 147B

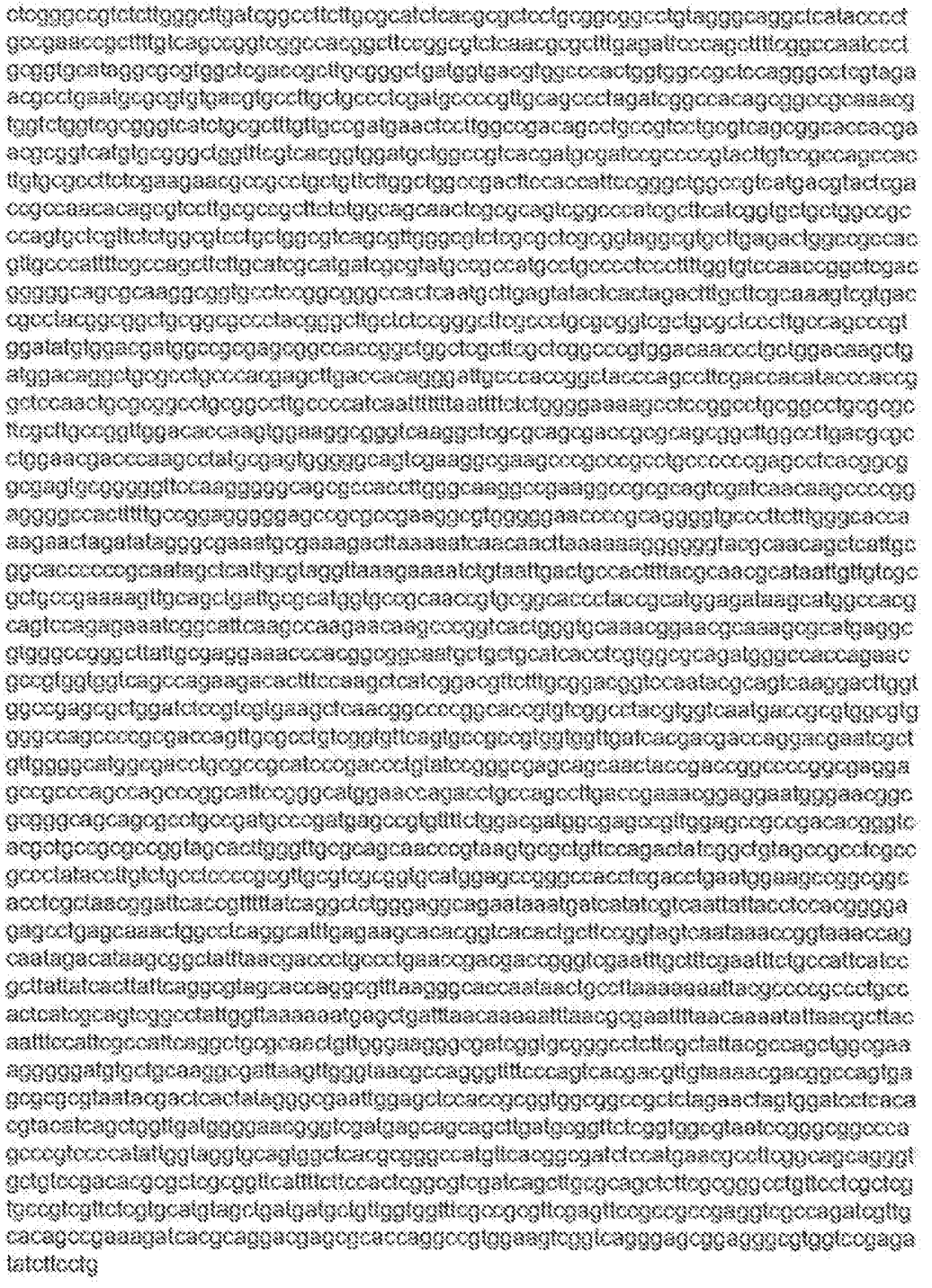

ctcgggccgtctcttgggctgatcggccttcttgcgcatctcaacgcgctcctgcggcggcctgtagggcaggctcataccct
gccgaaccgcttttgtcagccggtcggccacggcttccggcgtctcaacgcgcttgagattccagcttttcggccaatccct
gcggtgcatagccgcgtggctccgacccgcttgcgggctgatggtgacgtggcccactggtggccgctccagggcctcgtaga
acgcctgaatgcgcgtgtgacgtgccttgctgccctcgatgccccgttgcagccctagatcggccacagcggccgcaaacg
tggtctggtccgcgggtcatctgcgcttttgttgccgatgaactcctttggccgacagcctgccgtcctgcgtcagcggcaccacga
acgcggtcatgtgcgggctggtttcgtcacggtggatgctggccgtcacgatgcgatccgccccgtacttgtccgccagccac
ttgtgcgcctctcgaagaacgccgcctgctgttcttggctggccgacttccaccattccgggctggccgtcatgacgtactcga
ccgccaacacagcgtccttgccgccgcttctctggcagcaactcgccgcagtcggcccatcgcttcatcggtgctgctggccgc
ccagtgctcgttctctggcgtcctgctggcgtcagcgttgggcgtctcgcgctcgcggtaggcgtgcttgagactggccgccac
gttgcccatttttgccagcttcttgcatccgcatgatcgcgtatgccgccatgcctgcccctccctttggtgtccaaccggctgac
gggggcagccgcaaggcggtgcctccggcgggccactcaatgcttgagtatactcactagacttgcttgccaaagtcgtgac
cgcctacggccggctgcggcgccctacgggcttgctctccgggcttcgccctgccgcggtcgctgccgctccctgccagcccgt
ggatatgtggaccgatggccgcgagcggccaccggctggctgcttcgctggccgtggacaaccctgctggacaagctg
atggacaggctgcgcctgcccacgagcttgaccacagggattgcccaccggctacccagccttcgaccacatacccaccg
gctccaactgccgcggcctgcggccttgccccatcaatttttttaattttctctgggggaaaagcctccggcctgcggcctgccgcgc
ttcgcttgccggttggacaccaagtggaaggcgggtcaaggctcgcgcagcgaccgcgcagcggcttggccttgaacgcgc
ctggaacgacccaagcctatgcgagtgggggcagtcgaaggcgaagccgcccgcctgcccccgagcctcacggcg
gcgagtgcgggggttccaagggggcagcgccaccttgggcaaggccgaaggccgcgcagtcgatcaacaagcccccgg
agggccacttttgccggaggggggagccgcgccgaaggcgtgggggaacccgcaggggtgcccttcttgggcaccca
aagaactagatataggcgaaatgcgaaagacttaaaaatcaacaacttaaaaaaggggggtacgcaacagctcattgc
ggcacccccgcaatagctcattgcgtaggttaaagaaaatctgtaattgactgccacttttacgcaacgcataattgttgtcgc
gctgccgaaaagttgcagctgattgcgcatggtgccgcaaccgtgcggcaccctaccgcatggagataagcatggccacg
cagtccagagaaatcggcattcaagccaagaacaagcccggtcactgggtgcaaacggaacgcaaagcgcatgaggc
gtgggccgggcttattgcgaggaaacccacggcggcaatgctgctgcatcacctcgtggcgcagatgggccaccagaac
gccgtggtggtcagccagaagcacacttccaagctcatcggacgttcttgcggacggtccaatacgcagtcaaggacttggt
ggccgagcgctggatctccgtcgtgaagctcaacggcccccggcaccgtgtcggcctacgtggtcaatgaccgcgtggcgtg
gggccagcccccgcgaccagttgcgcctgtcggtgttcagtgccgccgtggtggttgatcacgacgaccaggacgaatcgct
gttggggcatggcgacctgcgccgcatccgcacctgtatccgggcgagcagcaaactaccgaccggccccggcgaggga
gccgcccagccagccccggcattcccgggcatggaaccagacctgccagccttgaccgaaaaggaggaatggggaacggc
gcgggcagcagcgcctgccgatgccgatgagccgtgtttctggacgatggcgagccgttggagccgccgacacggggtc
acgctgccgccgccggtagcacttgggttgcgcagcaacccgtaagtgcgctgttccagactatcggctgtagccgcctcgcc
gccctatccttgtctgcctcccccgcgttgcgtcgcggtgcatggagccgggccacctcgacctgaatggaagccggcggc
acctcgctaacggattcacgttttatcaggctctgggaggcagaataaatgatcatatcgtcaattattacctccacgggga
gagcctgagcaaactggcctcaggcatttgagaagcacacggtcacactgcttccggtagtcaataaaccggtaaaccag
caatagacataagcgggctatttaacgaccctgccctgaaccgacgaccgggtcgaatttgctttcgaatttctgccattcatcc
gcttattatcacttattcaggcgtagcaccaggcgtttaagggcaccaataactgccttaaaaaaaattacgccccgccctgcc
actcatgcagtcggcctattggttaaaaaatgagctgatttaacaaaaatttaacgcgaattttaacaaaatattaacgcttac
aatttccattcgccattcaggctgcgcaactgttgggaagggcgatcggtgcgggcctcttcgctattacgccagctggcgaa
aggggatgtgctgcaaggcgattaagttgggtaacgccagggttttcccagtcacgacgttgtaaaacgacggccagtga
gcgcgcgtaatacgactcactatagggcgaattggagctccaccgcggtggcggccgctctagaactagtggatcctcaca
cgtacatcagctggttgatggggaacgggtcgatgagcagcagctgatgcggttctcggtggcgtaatcgggcggccca
gccccgtcccatatggtaggtgcaggggctcacgcgggccatgttcaggcgatctccatgaacgccttcggcagcagggt
gctgtccgacacgcgctcgcggttcatttcttccactcggcgtcgatcagcttgccgcagctcttcgcgggcctgttcctgctcg
tgccgtcgttctcgtgcatgtagctgatgatgctgtggtggttcgccgcgttcgagttccgccgcgaggtcgccagatcgttg
cacagccgaaagatcacgcaggacgagcgcaccaggccgtggaagtcggtcagggagcggagggcgtggtccgaga
tatcttcctg

Fig. 147C

ctgctggcagaccgagaagtagctcggcgccagcagcgcgaccccgctggaggacacgctggcgttctccaggtacttgct
gaaggcggggatgatcttgttattgctccacttggcttcttgccaggaaggccttgccacagttcgcgccagctttttggtcagatagct
caggttattgtggcccttctccttccaggatggagtaggacgtgtcgttcacggtgttgtacagggccaggaagcacagcttcatat
agtcgggcagcgtgttgatggcgttcacgtcccagcgttccaccgcgtcggtgaagagcgcgcagttcgtccagggtaccgtac
acgtcatagacgtcatcgataatggtgaccagacgaacatcttggtgacggccttgcggcattgccgaactgcgggtccggg
cgccatgcccagcgcccagaagtacacttccatcaggcggtcccgcacgaaatccagcttgctggcgaggcccatctgggtc
caccacggctcaggtcctgcagctcttttggtgcagggtctggaccatgttgaaatcgagttttggccagttccagcagcagct
ggtgatgcggctccttgggttcgtacttgtccagaaaccacgcgcctccaggcgggtgcaggcgttgatgatacggcagctcc
agcgcgtgggacacctgctcggccaccttcgtgttgatcccctccttgaggttgttcttcagatgggtgatgctgaaggtacgggc
ctcctccagcagattttcgccttcgaaaccgagatagctggcctcgtacaggctcagcaggccctgcacgtcaccctttcagttcc
ccggagaagccccctttttgtccttgaagcgctcgaacacgtcctggctcacctcaaagccatgctgccgcagcaggcgga
agctcagggcggtcgcgtgcagatcgctttgttcttcttattctcgtccagcaggacgatgttctccagcgccttgatgatatcttct
caaacttgtaggtcaggcccaggcgctgcacgtcgtcgatgagctccagcaggctcaggggctgggtgttccacccggttgat
catgcaacgcacctcctcctccagctggtggccttctcttcgagcttctccaccttcaggtcgtttccaggctctgcaggaaactcg
aagttccacaggttgggctggtagttcgcggaccgacggctattatgctcggtgatctgggtgaactggctgctggtggcgcac
atatgtatatctcctttcttaaagttaaacaaagcttatcgatacgtcgacctcgaggggggggcccggtacccagcttttgttccctti
agtgagggttaattgcgcgcttggcgtaatcatggtcatagctgtttcctgtgtgaaattgttatccgctcacaattccacacaacat
acgagccggaagcataaagtgtaaagcctggggtgcctaatgagtgagctaactcacattaattgcgttgcgctcactgcccg
ctttccagtcgggaaacctgtcgtgccagctgcattaatgaatcggccaacgcgcggggagaggcggtttgcgtattgggcgc
atgcataaaaactgttgtaattcattaagcattctgccgacatggaagccatcacaaacggcatgatgaacctgaatcgccag
cggcatcagcaccttgtcgccttgcgtataatatttgcccatggacgcacacgtggaaacggatgaaggcacgaaacccagtt
gacataagcctgttcggttcgtaaactgtaatgcaagtagcgtatgcgctcacgcaactggtccagaaccttgaccgaacgca
gcggtggtaacggcgcagtggcggttttcatggcttgttatgactgttttttgtacagtctatgcctcgggcatccaagcagcaag
cgcgttacgccgtgggtcgatgtttgatgttatggagcagcaacgatgttacgcagcagcaacgatgttacgcagcagggcag
tcgccctaaaacaaagttaggtggctcaagtatgggcatcattcgcacatgtaggctcggcctgaccaagtcaaatccatgc
gggctgctctgatcttttcggtcgtgagttcggagacgtagccacctactcccaacatcagccggactccgattacctcgggaa
cttgctccgtagtaagacattcatcgcgcttgctgccttcgaccaagaagcggttgttggcgctctcgcggccttacgttctgcccag
gtttgagcagccgcgtagtgagatctatatctatgatctcgcagtctccggcgagcaccggaggcagggcattgccacccgcgc
tcatcaatctcctcaagcatgaggccaacgcgcttggtgcttatgtgatctacgtgcaagcagattacggtgacgatccccgcagt
ggctctctatacaaagttgggcatacgggaagaagtgatgcacttgatatcgacccaagtaccgccacctaacaattcgttca
agccgagatcggcttccggccgcggagttgttcggtaaattgtcacaacgccgccaggtggcacttttcggggaaatgtgcg
cgcccgcgttcctgctggcgctgggcctgtttctggcgctggacttcccgttcgtcagcagcttttgcccacaggccttgatg
atcgcggcggccttggcctgcatatcccgattcaacggcccccagggcgtccagaacgggcttcaggcgctcccgaaggt

(SEQ ID NO:122)

Fig. 148

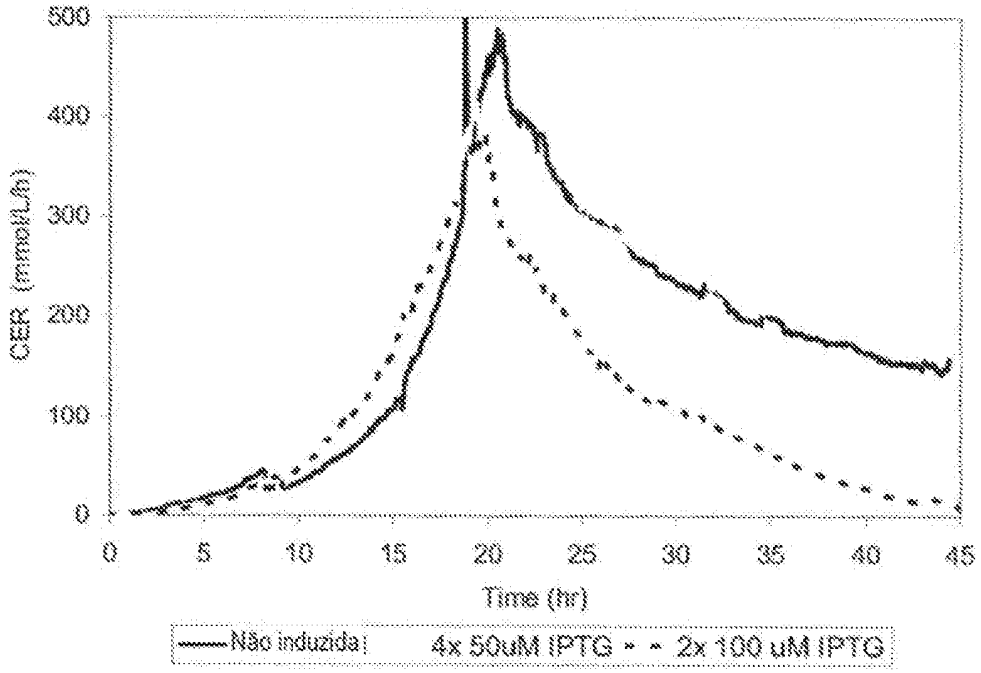

500
400
300
200
100
0
CER (mmol/L/h)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
Time (hr)
Não induzida
4x 50uM IPTG
2x 100 uM IPTG

Fig. 149

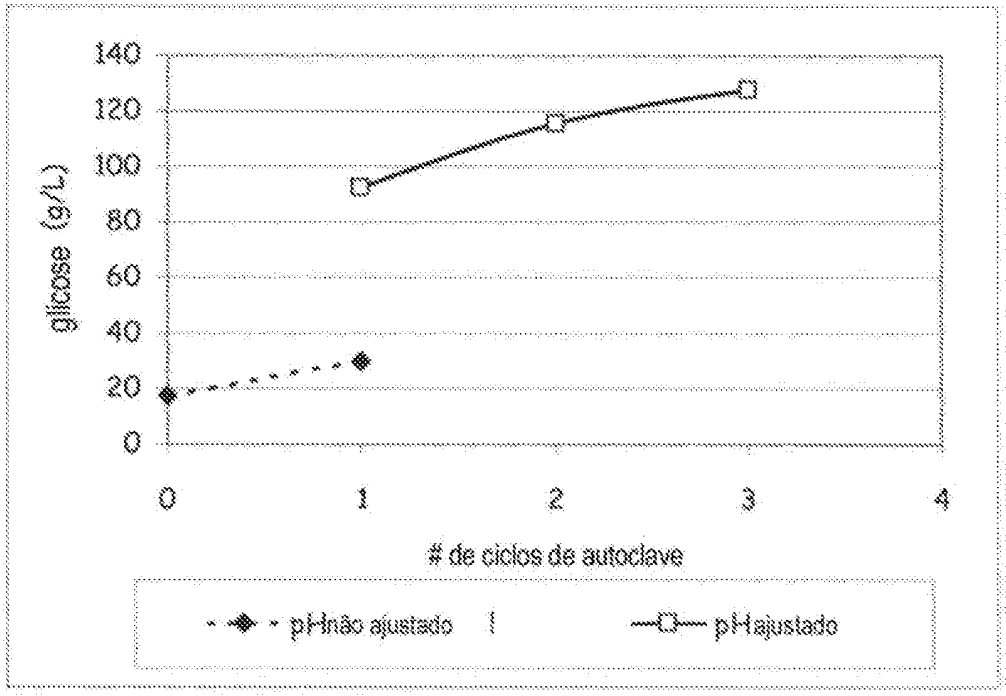

140
120
100
80
60
40
20
0
glicose (g/L)
0
1
2
3
4
de ciclos de autoclave
pH não ajustado
pH ajustado

Fig. 150

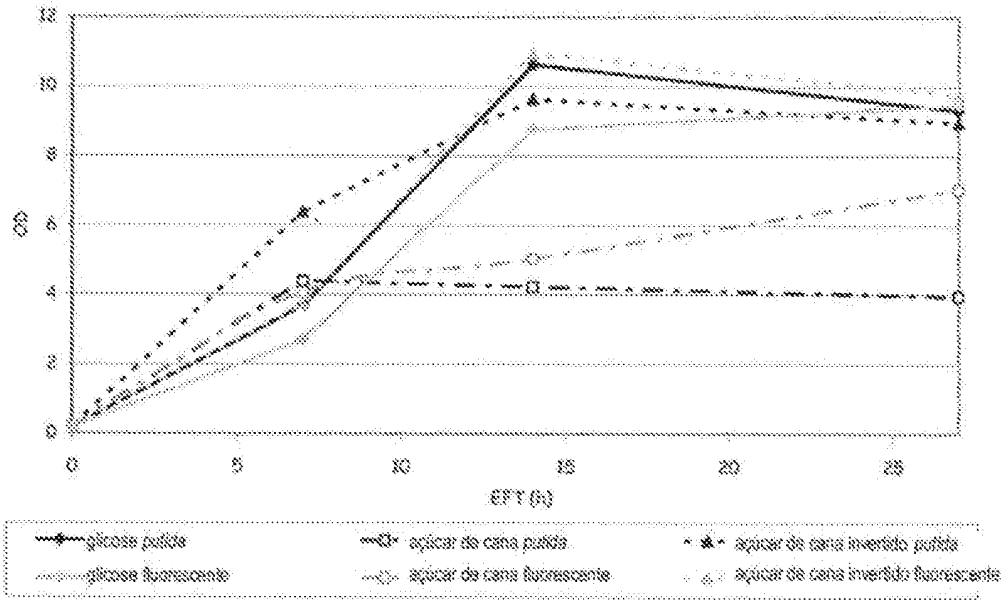

12
10
8
6
4
2
0
0
5
10
15
20
25
EFT (h)
glicose pulsa
açúcar de cana pulsa
açúcar de cana invertido pulsa
glicose fluorescente
açúcar de cana fluorescente
açúcar de cana invertido fluorescente

Fig. 151

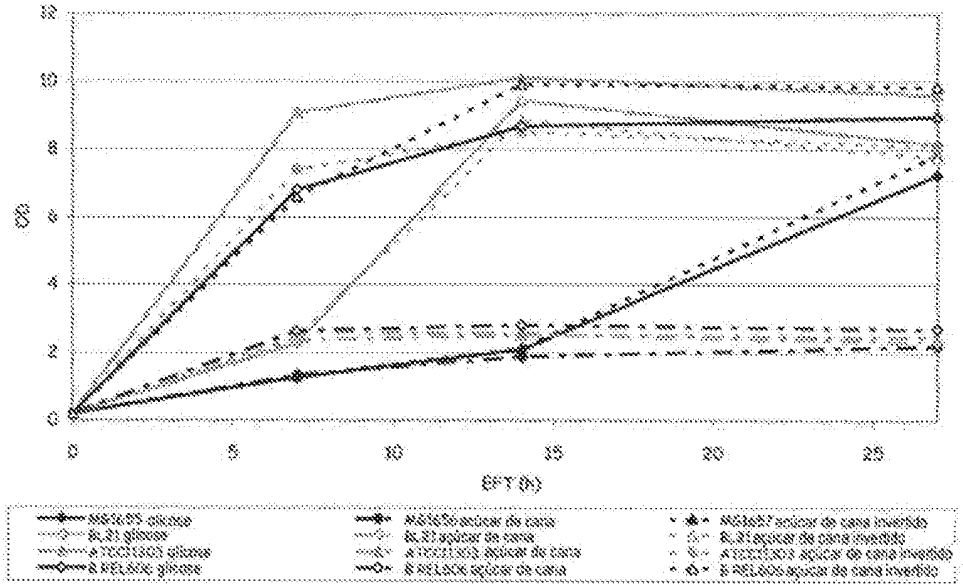


Fig. 152A

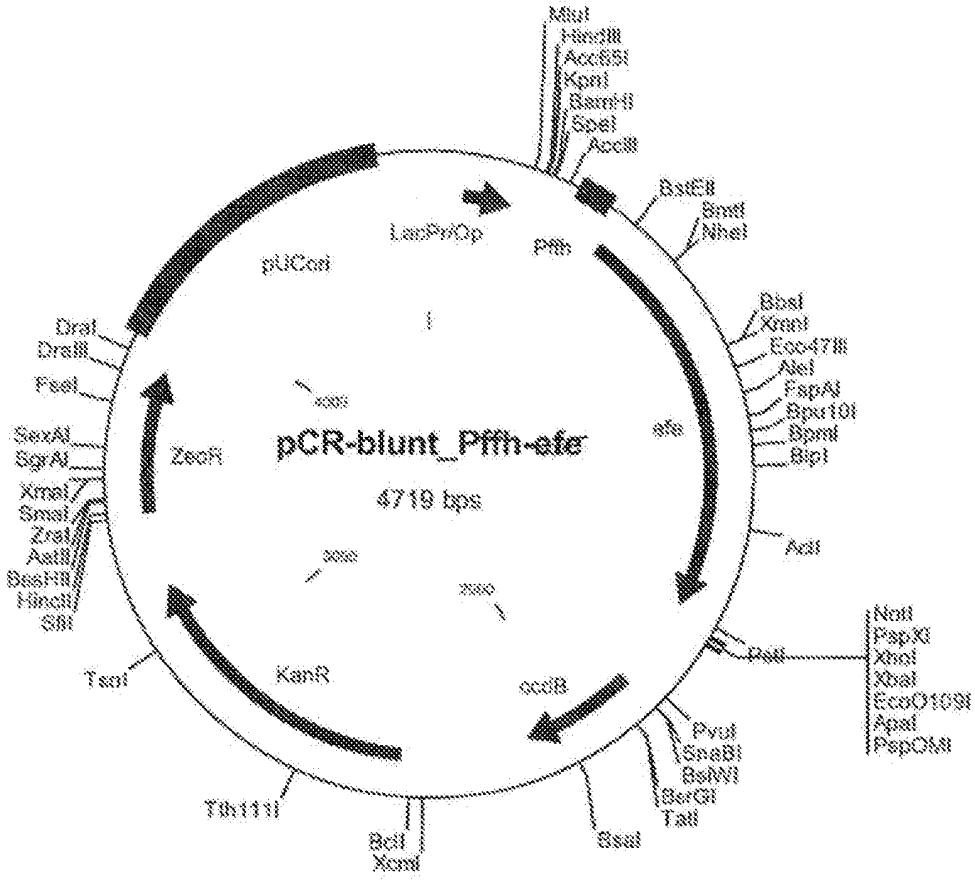

MluI
HindIII
Acc65I
KpnI
BamHI
SpeI
AccIII
BstEII
BmtI
NheI
BbsI
XbaI
Eco47III
AleI
FspAI
Bpu10I
BpmI
BipI
AclI
NotI
PspXI
XhoI
XbaI
EcoO109I
ApaI
PspOMI
PvuI
SnaBI
BsiWI
BsrGI
TatI
SsaI
BclI
XcmI
Tth111I
KanR
TseI
HincII
SfiI
BssHII
AatII
ZraI
SmaI
XmaI
SgrAI
SexAI
FseI
DraIII
DraI
ZeoR
pUCori
LacPrOp
Pffh
efe
ccdB
pCR-blunt_Pffh-efe
4719 bps

Fig. 152B

AGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCA
CGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCA
CTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGA
GCGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTATTTAGGTGAC
GCGTTAGAATACTCAAGCTATGCATCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGC
CGCCAGTGTGCTGGAATTCAGGCGGTCCGGAAAGAGAAGCAGTATAGCGTCAGGTGAACGC
TGCTCCAACCGTTGCATAACAACAAAGACGCCTTCATGTTATACTGCGGCAAAATACTGATGA
TGTGTCCGCGATTGCGGCCAACCGTTTCCACCCCAGGCGAGAGACAATGACCAACCTACAGA
CTTTCGAGTTACCTACCGAGGTAACCGGCTGCGCCGCCGATATCTCATTGGGAAGGGCGCT
GATCCAAGCCTGGCAAAAAGATGGCATTTTTCAGATCAAGACCGATAGTGAGCAGGATCGCA
AAACGCAGGAAGCAATGGCTGCTAGCAAGCAGTTTTGCAAGGAACCGCTGACTTTTAAGAGT
AGCTGCGTTAGCGATCTGACCTACAGCGGCTATGTTGCGTCAGGCGAGGAAGTCACAGCTG
GTAAACCTGATTTCCCTGAAATCTTCACTGTCTGCAAGGACTTGTCGGTAGGCGATCAGCGT
GTAAAAGCCGGCTGGCCTTGCCATGGTCCGGTGCCATGGCCAAATAACACCTATCAGAAAAG
CATGAAGACCTTCATGGAAGAGCTGGGTTTAGCGGGCGAACGGTTGCTCAAACTGACAGCG
CTCGGCTTTGAACTACCCATCAACACGTTCACCGACTTAACTCGCGATGGTTGGCACCACAT
GCGTGTATTACGCTTCCCGCCCCAAACATCCACGCTGTCCCGTGGAATTGGTGCGCACACTG
ACTATGGGTTGTTGGTAATTGCCGCTCAGGACGATGTTGGTGGCTTATATATTCGCCCTCCAG
TCGAGGGAGAGAAGCGTAATCGTAACTGGTTGCCTGGTGAGAGCTCAGCAGGCATGTTTGA
GCACGATGAACCTTGGACCTTCGTGACGCCCACCCCAGGCGTGTGGACAGTTTTCCCAGGT
GATATCTTGCAGTTCATGACCGGCGGCCAGCTGCTTTCCACTCCGCACAAGGTTAAGCTCAA
TACCCGCGAACGTTTCGCCTGCGCTTATTTTCATGAGCCTAATTTTGAAGCATCCGCCTATCC
GTTGTTCGAGCCCAGCGCCAATGAGCGTATTCATTATGGTGAGCACTTTACCAACATGTTTAT
GCGTTGCTATCCAGATCGGATCACCACCCAGAGCATCAACAAGGAGAATCGCCTGGCGCACT
TGGAGGACTTGAAGAAGTATTCGGACACCCGCGCGACAGGCTCATGACGGTCCGCCTGAAT
TCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCC
TATAGTGAGTCGTATTACAATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCT
GGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGA
AGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTATACGTACGGCAGTTTAAG
GTTTACACCTATAAAAGAGAGAGCCGTTATCGTCTGTTTGTGGATGTACAGAGTGATATTATT
GACACGCCGGGGCGACGGATGGTGATCCCCCTGGCCAGTGCACGTCTGCTGTCAGATAAAG
TCTCCCGTGAACTTTACCCGGTGGTGCATATCGGGGATGAAAGCTGGCGCATGATGACCACC
GATATGGCCAGTGTGCCGGTCTCCGTTATCGGGGAAGAAGTGGCTGATCTCAGCCACCGCG
AAAATGACATCAAAAACGCCATTAACCTGATGTTCTGGGGAATATAAATGTCAGGCATGAGAT
TATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTCACGTAGAAAGCCAGTCCGCAGAAACGGTGCT
GACCCCGGATGAATGTCAGCTACTGGGCTATCTGGACAAGGGAAAACGCAAGCGCAAAGAG
AAAGCAGGTAGCTTGCAGTGGGCTTACATGGCGATAGCTAGACTGGGCGGTTTTATGGACAG
CAAGCGAACCGGAATTGCCAGCTGGGGCGCCCTCTGGTAAGGTTGGGAAGCCCTGCAAAGT
AAACTGGATGGCTTTCTTGCCGCCAAGGATCTGATGGCGCAGGGGATCAAGCTCTGATCAAG
AGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCC
GCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATG
CCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTC
CGGTGCCCTGAATGAACTGCAAGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGG
CGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTG
GGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCAT
CATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTCGACCAC
CAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGG
ATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACTGTTCGCCAGGCTCAAGGC
GAGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATC

ATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCG
GACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGC
GAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTCGCAGCGC
ATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAATTATTAACGCTTACAATTTCCTG
ATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTCACACCGCATCAGGTGGCACTT
TTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGT
ATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATAGCACGTGAGGAGGGC
CACCATGGCCAAGTTGACCAGTGCCGTTCCGGTGCTCACCGCGCGCGACGTCGCCG
GAGCGGTCGAGTTCTGGACCGACCGGCTCGGGTTCTCCCGGGACTTCGTGGAGGAC
GACTTCGCCGGTGTGGTCCGGGACGACGTGACCCTGTTCATCAGCGCGGTCCAGGA
CCAGGTGGTGCCGGACAACACCCTGGCCTGGGTGTGGGTGCGCGGCCTGGACGAGC
TGTACGCCGAGTGGTCGGAGGTCGTGTCCACGAACTTCCGGGACGCCTCCGGGCCG
GCCATGACCGAGATCGGCGAGCAGCCGTGGGGGCGGGAGTTCGCCCTGCGCGACC
CGGCCGGCAACTGCGTGCACTTCGTGGCCGAGGAGCAGGACTGACACGTGCTAAAA
CTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAA
ATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAG
GATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCA
CCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGG
TAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTA
GGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGT
TACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGAC
GATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAG
CCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGA
GAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAG
GGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTA
TAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCA
GGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCC
TTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAA
CCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCG
CAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAG

Fig. 153

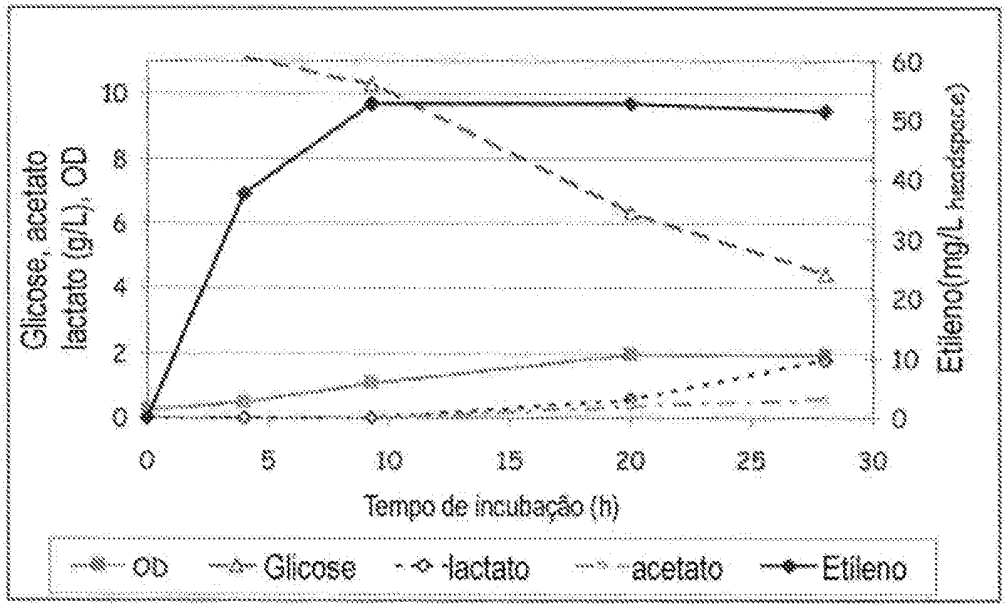

Glicose, acetato
lactato (g/L), OD
Etileno(mg/L headspace)
Tempo de incubação (h)
0
2
4
6
8
10
0
10
20
30
40
50
60
0
5
10
15
20
25
30
OD
Glicose
lactato
acetato
Etileno

Fig. 154

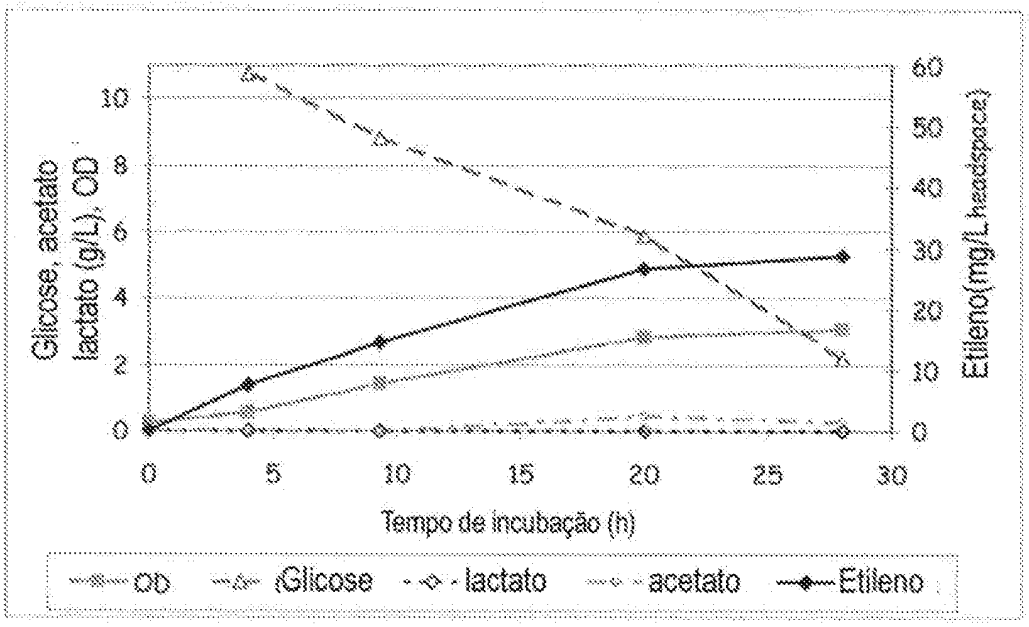
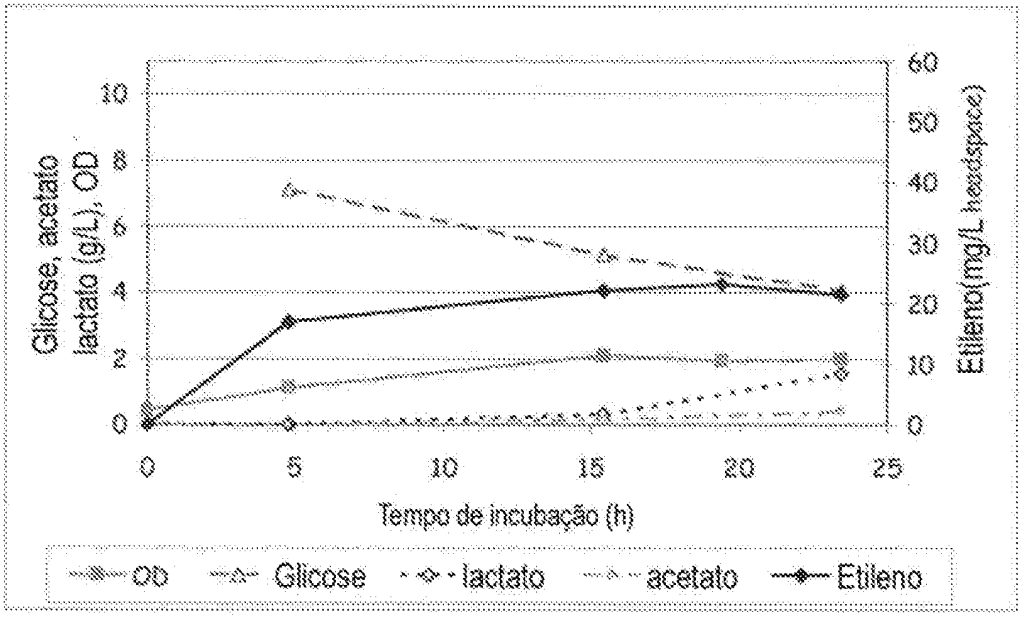

Glicose, acetato
lactato (g/L), OD
Etileno(mg/L headspace)
Tempo de incubação (h)
0
2
4
6
8
10
0
10
20
30
40
50
60
0
5
10
15
20
25
30
OD
Glicose
lactato
acetato
Etileno

Fig. 155


Glicose, acetato
lactato (g/L), OD
Etileno(mg/L headspace)
Tempo de incubação (h)
OD
Glicose
lactato
acetato
Etileno

RESUMO

Patente de Invenção: **"SISTEMAS USANDO CULTURA DE CÉLULAS PARA A PRODUÇÃO DE ISOPRENO".**

A presente invenção refere-se a métodos para produzir isopreno a partir de células cultivadas. A invenção refere-se também a composições que incluem essas células cultivadas. A invenção refere-se a composições de isopreno, como composições com quantidade aumentada de isopreno ou pureza aumentada. Adicionalmente, a invenção refere-se a métodos para produzir isopreno ao mesmo tempo em que mantém a viabilidade celular e/ou atividade metabólica.