



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

(11) PI 1015313-6 B1



(22) Data do Depósito: 27/04/2010

(45) Data de Concessão: 01/06/2021

(54) Título: MÉTODO FERMENTATIVO PARA PRODUZIR UM ÉSTER DE ÁCIDO GRAXO EMPREGANDO UM MICRO-ORGANISMO GENETICAMENTE MODIFICADO E MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE ÉSTERES DE ÁCIDOS GRAXOS

(51) Int.Cl.: C12P 7/64.

(30) Prioridade Unionista: 27/04/2009 US 61/173,016; 29/05/2009 US 61/182,564.

(73) Titular(es): GENOMATICA, INC..

(72) Inventor(es): FERNANDO SANCHEZ-RIERA; STEPHEN B. DEL CARDAYRE; FERNANDO VALLE.

(86) Pedido PCT: PCT US2010032580 de 27/04/2010

(87) Publicação PCT: WO 2010/126891 de 04/11/2010

(85) Data do Início da Fase Nacional: 26/10/2011

(57) Resumo: MÉTODO PARA PRODUZIR ~ ÉSTER DE ÁCIDO GRAXO, ÉSTER DE ÁCIDO GRAXO PRODUZIDO, MÉTODO PARA PRODUZIR ~ ÉSTER ETÍLICO DE ÁCIDO GRAXO E MICRORGANISMO GENETICAMENTE ENGENHEIRADO A presente invenção se refere a métodos para produzir ésteres de ácido graxo, tais como ésteres etílicos de ácido graxo, a partir de microrganismos geneticamente engenheirados para alterar a expressão de genes envolvidos na síntese de ácido graxo e/ou produção de etanol, de modo que é obtido um microrganismo que pode produzir um álcool, um ácido graxo e uma éster sintase na ausência de alcoóis adicionados de modo exógeno.

**"MÉTODO FERMENTATIVO PARA PRODUZIR UM ÉSTER DE ÁCIDO GRAXO
EMPREGANDO UM MICRO-ORGANISMO GENETICAMENTE MODIFICADO E
MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE ÉSTERES DE ÁCIDOS GRAXOS"**

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

[0001] Este pedido reivindica o benefício dos Pedidos de Patente Provisórios Norte-americanos Nos: 61/173.016, depositado em 27 de abril de 2009; e 61/182.564, depositado em 29 de maio de 2009, cujos conteúdos completos são aqui incorporados a título de referência.

CAMPO TÉCNICO

[0002] Esta descrição se refere, em geral, a métodos de usar células geneticamente modificadas e micro-organismos para produzir ésteres de ácido graxo, e a ésteres de ácido graxo produzidos por esses métodos. Os produtos são particularmente utilizáveis como biocombustíveis.

Fundamentos da Invenção

[0003] O petróleo é um recurso natural limitado, encontrado na Terra nas formas líquida, gasosa e sólida. O petróleo é primordialmente composto de hidrocarbonetos, os quais compreendem principalmente de carbono e hidrogênio. Ele também contém quantidades significativas de outros elementos, tais como, nitrogênio, oxigênio ou enxofre em diferentes formas.

[0004] O petróleo é um valioso recurso, mas os produtos de petróleo são desenvolvidos a custos consideráveis, tanto financeiramente quanto ambientalmente. Primeiro, as fontes de petróleo precisam ser descobertas. A

exploração de petróleo é uma aventura dispendiosa e arriscada. O custo de exploração em poços de água profunda pode exceder US\$ 100 milhões. Adicionalmente aos custos econômicos, a exploração de petróleo envolve um custo ambiental elevado. Por exemplo, a exploração *offshore* perturba a redondeza dos ambientes marinhos.

[0005] Após ser descoberto um poço produtivo, o petróleo precisa ser extraído da Terra com grande despesa. Mesmo sob as melhores circunstâncias, somente 50% do petróleo em um poço pode ser extraído. A extração de petróleo também acarreta um custo ambiental. Por exemplo, a extração de petróleo pode resultar em grandes derramamentos de petróleo que chega à superfície. A perfuração *offshore* envolve a dragagem do leito do mar que rompe ou destrói a redondeza do ambiente marinho.

[0006] Após a extração, o petróleo pode ser transportado ao longo de grandes distâncias desde as regiões produtoras de petróleo até as regiões consumidoras de petróleo. Adicionalmente, aos custos de embarque, há também o risco ambiental de espalhamento devastador de óleo.

[0007] Em sua forma natural, o óleo bruto extraído da Terra tem poucos usos comerciais. Ele é uma mistura de hidrocarbonetos (por exemplo, parafinas (ou alcanos), olefinas (ou alcenos), alcinos, naftenos (ou cicloalcanos), compostos alifáticos, compostos aromáticos, etc.) de variado comprimento e complexidade. Adicionalmente, o petróleo bruto contém outros compostos orgânicos (por exemplo, compostos orgânicos contendo nitrogênio, oxigênio, enxofre, etc.) e impurezas (por exemplo, enxofre, sal, ácido, metais, etc.).

[0008] Portanto, o petróleo bruto precisa ser refinado e purificado antes que possa ser usado comercialmente. Devido à sua alta densidade de energia e à sua fácil transportabilidade, a maior parte do petróleo é refinada na forma de combustíveis, tais como combustíveis de transporte (por exemplo, gasolina, diesel, combustível de aviação, etc.), óleo de aquecimento, gás liquefeito de petróleo, etc.

[0009] O petróleo bruto também é uma fonte primária de matérias-primas para produção de produtos petroquímicos. As duas principais classes de matérias-primas derivadas de petróleo são as olefinas de cadeia curta (por exemplo, etileno e propileno) e aromáticos (por exemplo, benzeno e isômeros de xileno). Essas matérias-primas são derivadas de hidrocarbonetos de cadeia mais longa presentes no petróleo bruto por craqueamento de hidrocarbonetos de cadeia longa com considerável gasto usando uma variedade de métodos, como craqueamento catalítico, craqueamento com vapor ou reforma catalítica. Essas matérias-primas são usadas para produzir produtos petroquímicos, os quais não podem ser diretamente refinados a partir do petróleo bruto, tais como monômeros, solventes, detergentes ou adesivos.

[0010] Um exemplo de matéria-prima derivada de petróleo bruto é o etileno. Etileno é usado para produzir produtos petroquímicos tais como, polietileno, etanol, óxido de etileno, etileno glicol, poliéster, glicol éter, etoxilato, acetato de vinila, 1,2-dicloroetano, tricloroetileno, tetracloroetileno, cloreto de vinila e cloreto de polivinila. Outro exemplo de matéria-prima derivada de petróleo bruto é o propileno. Propileno é usado

para produzir álcool isopropílico, acrilonitrila, polipropileno, óxido de propileno, propileno glicol, glicol éteres, butileno, isobutileno, 1,3-butadieno, elastômeros sintéticos, poliolefinas, alfa-olefinas, alcoóis graxos, ácido acrílico, polímeros acrílicos, cloreto de alila, epicloroidrina e resinas epóxi.

[0011] Os produtos petroquímicos podem ser usados para produzir produtos de química fina, tais como plásticos, resinas, fibras, elastômeros, produtos farmacêuticos, lubrificantes ou géis. Exemplos de produtos de química fina que podem ser produzidos a partir de matérias-primas petroquímicas são: ácidos graxos, hidrocarbonetos (por exemplo, hidrocarbonetos de cadeia longa, hidrocarbonetos de cadeia ramificada, hidrocarbonetos saturados, hidrocarbonetos insaturados, etc.), alcoóis graxos, ésteres, aldeídos graxos, cetonas, lubrificantes, etc.

[0012] Produtos de química fina têm muitos usos comerciais. Ácidos graxos são usados comercialmente como tensoativos. Os tensoativos podem ser encontrados em detergentes e sabões. Ácidos graxos também podem ser usados como aditivos em combustíveis, óleos lubrificantes, tintas, vernizes, velas, óleos de solda, gorduras para massas, cosméticos e emulsificantes. Adicionalmente, os ácidos graxos são usados como ativadores aceleradores em produtos de borracha. Os ácidos graxos podem ser usados como uma matéria-prima para produzir ésteres metílicos, amidas, aminas, cloretos ácidos, anidridos, dímeros de ceteno e peróxi ácidos e ésteres.

[0013] Os hidrocarbonetos têm muitos usos comerciais. Por exemplo, alcanos de cadeia curta são usados

como combustíveis. Metano e etano são os principais constituintes de gás natural. Alcanos de cadeia mais longa (por exemplo, de cinco a dezesseis carbonos) são usados como combustíveis de transporte (por exemplo, gasolina, diesel ou combustível de aviação). Alcanos tendo mais do que dezesseis átomos de carbono são importantes componentes de óleos combustíveis e óleos lubrificantes. Mesmo alcanos mais longos, que são sólidos à temperatura ambiente, podem ser usados, por exemplo, parafina graxa. Alcanos que contêm aproximadamente trinta e cinco carbonos são encontrados em betume, o qual é usado para revestimento de estradas. Adicionalmente, alcanos mais longos podem ser craqueados para produzir hidrocarbonetos de cadeia mais curta utilizáveis comercialmente.

[0014] Da mesma forma que alcanos de cadeia curta, os alcenos de cadeia curta são usados em combustíveis de transporte. Os alcenos de cadeia mais longa são usados em plásticos, lubrificantes e lubrificantes sintéticos. Adicionalmente, os alcenos são usados como matéria-prima para produzir alcoóis, ésteres, plastificantes, tensoativos, aminas terciárias, agentes de recuperação de óleo aperfeiçoado, ácidos graxos, tióis, anidridos alquenilsuccínicos, epóxidos, alcanos clorados, alcenos clorados, parafinas, aditivos de combustível e redutores de fluxo de arraste.

[0015] Os alcoóis graxos têm muitos usos comerciais. Os alcoóis de cadeia mais curta são usados nas indústrias de cosméticos e de alimentos como emulsificantes, emolientes e espessantes. Devido à sua natureza anfifílica, os alcoóis graxos se comportam como tensoativos não-iônicos, os quais

são utilizáveis em detergentes. Adicionalmente, os alcoóis graxos são usados em graxas, colas, resinas, pomadas e loções farmacêuticas, aditivos de óleo lubrificantes, agentes anti-estáticos e de acabamento de têxteis, plastificantes, cosméticos, solventes industriais e solventes para gorduras.

[0016] Os ésteres têm muitos usos comerciais. Por exemplo, biodiesel, um combustível alternativo, compreende ésteres (por exemplo, éster metílico de ácido graxo, ésteres etílicos de ácido graxo, etc.). Alguns ésteres de baixo peso molecular são voláteis com um odor agradável que os torna utilizáveis em fragrâncias ou agentes flavorizantes. Adicionalmente, os ésteres são usados como solventes para lacas, tintas e vernizes. Além disso, algumas substâncias de ocorrência natural, tais como parafinas, gorduras e óleos compreendem ésteres. Os ésteres também são usados como agentes amaciantes em resinas e plásticos, plastificantes, retardantes de chama e aditivos em gasolina e óleo. Adicionalmente, ésteres podem ser usados na manufatura de polímeros, filmes, têxteis, corantes e produtos farmacêuticos.

[0017] Aldeídos são usados para produzir muitos produtos de química fina. Por exemplo, aldeídos são usados para produzir polímeros, resinas, corantes, flavorizantes, plastificantes, perfumes, produtos farmacêuticos e outros produtos químicos. Alguns são usados como solventes, preservantes ou desinfetantes. Alguns compostos naturais ou sintéticos, tais como vitaminas e hormônios são aldeídos. Em adição, muitos açúcares contêm grupos aldeído.

[0018] Cetonas são usadas comercialmente como solventes. Por exemplo, acetona é frequentemente usada como

solvente, mas também é uma matéria-prima na produção de polímeros. As cetonas também são usadas em lacas, tintas, explosivos, perfumes e processamento de têxteis. Adicionalmente, as cetonas são usadas para produzir alcoóis, alcenos, alcanos, iminas e enaminas.

[0019] Adicionalmente, o petróleo bruto é uma fonte de lubrificantes. Os lubrificantes derivados do petróleo são tipicamente compostos de olefinas, particularmente poliolefinas e alfa-olefinas. Os lubrificantes podem ser refinados a partir do petróleo bruto ou do petróleo manufaturado usando matérias-primas refinadas a partir do petróleo bruto.

[0020] A obtenção desses produtos de química fina a partir do petróleo bruto requer um investimento significativo, assim como uma grande quantidade de energia. Ela também é um processo ineficiente porque frequentemente os hidrocarbonetos de cadeia longa no petróleo bruto são craqueados para produzir monômeros menores. Esses monômeros são depois usados como matéria-prima na manufatura de produtos mais complexos de química fina.

[0021] Adicionalmente aos problemas que ocorrem com a exploração, extração, transporte e refino do petróleo, o petróleo é um recurso limitado e em processo de diminuição. Estima-se que o consumo atual de petróleo no mundo é de 30 bilhões de barris por ano. É previsto que aos níveis atuais de produção, segundo algumas estimativas, as reservas mundiais de petróleo podem estar esgotadas antes do ano 2050.

[0022] Finalmente, a queima de combustíveis baseados em petróleo libera gases que contribuem para o efeito estufa (por exemplo, dióxido de carbono) e outras formas de poluição

do ar (por exemplo, monóxido de carbono, dióxido de enxofre, etc.). À medida em que a demanda mundial de combustíveis aumenta, a emissão de gases de efeito estufa e de outras formas de poluição do ar também aumenta. A acumulação de gases de efeito estufa na atmosfera leva a um aumento no aquecimento global. Portanto, adicionalmente ao dano ambiental localmente (por exemplo, derramamento de óleo, dragagem de ambientes marinhos, etc.), a queima de petróleo também danifica o ambiente globalmente.

[0023] Devido aos inerentes desafios impostos pelo petróleo, há a necessidade de uma fonte de petróleo renovável que não precise ser explorada, extraída, transportada por longas distâncias, ou substancialmente refinada como o petróleo. Há também a necessidade de uma fonte renovável de petróleo que possa ser produzida economicamente. Em adição, há a necessidade de uma fonte renovável de petróleo que não crie o tipo de dano ambiental produzido pela indústria de petróleo e pela queima de combustíveis baseados em petróleo. Por razões semelhantes, há também uma necessidade de uma fonte renovável de produtos químicos que são tipicamente derivados de petróleo.

Sumário Da Invenção

[0024] Esta descrição se refere à produção de ésteres graxos, tais como ésteres etílicos de ácido graxo ("FAEE"), a partir de micro-organismos geneticamente modificados sem o provimento de álcool exógeno aos micro-organismos. Em geral, os ésteres de ácido graxo são produzidos pelo cultivo de um micro-organismo que é geneticamente modificado para produzir um ácido graxo e pelo

menos uma éster sintase, na ausência de álcool exógeno, tal como etanol exógeno ou metanol exógeno. O micro-organismo também pode ser geneticamente modificado para aumentar a produção de etanol quando comparado a um micro-organismo do tipo selvagem.

[0025] Em um aspecto, a invenção caracteriza um método para produzir um éster de ácido graxo pelo cultivo de um micro-organismo geneticamente modificado na ausência de álcool exógeno, sendo que o micro-organismo é modificado para produzir um álcool, um ácido graxo e pelo menos uma éster sintase. Em algumas concretizações, o método ainda inclui a etapa de separação do éster de ácido graxo. Em outras concretizações, o álcool é etanol. Ainda em outras concretizações, o éster de ácido graxo é um éster etílico de ácido graxo.

[0026] Em algumas concretizações, o micro-organismo é cultivado em um meio de cultura compreendendo uma concentração inicial desde cerca de 2 g/L até cerca de 50 g/L de uma fonte de carbono. Em outras concretizações, o micro-organismo é cultivado em um meio de cultura compreendendo uma concentração inicial desde cerca de 2 g/L até cerca de 10 g/L de uma fonte de carbono. Em outras concretizações, o micro-organismo é cultivado em um meio de cultura compreendendo uma concentração inicial desde cerca de 2 g/L até cerca de 20 g/L de uma fonte de carbono. Em outras concretizações, o micro-organismo é cultivado em um meio de cultura compreendendo uma concentração inicial desde cerca de 20 g/L até cerca de 30 g/L de uma fonte de carbono. Em outras concretizações, o micro-organismo é cultivado em um meio de cultura compreendendo uma concentração inicial

desde cerca de 30 g/L até cerca de 40 g/L de uma fonte de carbono. Em outras concretizações, o micro-organismo é cultivado em um meio de cultura compreendendo uma concentração inicial desde cerca de 40 g/L até cerca de 50 g/L de uma fonte de carbono.

[0027] Em algumas concretizações, o método ainda inclui a etapa de monitoramento do nível de fonte de carbono no meio de cultura. Em algumas concretizações, o método ainda inclui a adição de fonte de carbono suplementar ao meio de cultura quando o nível da fonte de carbono no meio for menor que cerca de 0,5 g/L. Em algumas concretizações, o método ainda inclui a adição de uma fonte de carbono suplementar ao meio de cultura quando o nível da fonte de carbono no meio for menor que cerca de 0,4 g/L. Em algumas concretizações, o método ainda inclui a adição de uma fonte de carbono suplementar ao meio de cultura quando o nível da fonte de carbono no meio for menor que cerca de 0,3 g/L. Em algumas concretizações, o método ainda inclui a adição de uma fonte de carbono suplementar ao meio de cultura quando o nível da fonte de carbono no meio for menor que cerca de 0,2 g/L. Em algumas concretizações, o método ainda inclui a adição de uma fonte de carbono suplementar ao meio de cultura quando o nível da fonte de carbono no meio for menor que cerca de 0,1 g/L.

[0028] Em algumas concretizações, a fonte de carbono suplementar é adicionada para manter um nível de fonte de carbono desde cerca de 2 g/L até cerca de 5 g/L. Em algumas concretizações, a fonte de carbono suplementar é adicionada para manter um nível de fonte de carbono desde cerca de 2 g/L até cerca de 3 g/L. Em algumas concretizações, a fonte

de carbono suplementar é adicionada para manter um nível de fonte de carbono desde cerca de 3 g/L até cerca de 4 g/L. Em algumas concretizações, a fonte de carbono suplementar é adicionada para manter um nível de fonte de carbono desde cerca de 4 g/L até cerca de 5 g/L. Em algumas concretizações, a fonte de carbono é glicose.

[0029] Em algumas concretizações, o micro-organismo é cultivado em condições aeróbias. Em algumas concretizações, as condições aeróbias incluem desde cerca de 10% até cerca de 50% de oxigênio dissolvido. Em algumas concretizações, as condições aeróbias incluem desde cerca de 10% até cerca de 20% de oxigênio dissolvido. Em algumas concretizações, as condições aeróbias incluem desde cerca de 20% até cerca de 30% de oxigênio dissolvido. Em algumas concretizações, as condições aeróbias incluem desde cerca de 30% até cerca de 40% de oxigênio dissolvido. Em algumas concretizações, as condições aeróbias incluem desde cerca de 40% até cerca de 50% de oxigênio dissolvido.

[0030] Em outras concretizações, o micro-organismo é cultivado em uma temperatura desde cerca de 30°C até cerca de 35°C. Em outras concretizações, o micro-organismo é cultivado em uma temperatura desde cerca de 30°C até cerca de 31°C. Em outras concretizações, o micro-organismo é cultivado em uma temperatura desde cerca de 31°C até cerca de 32°C. Em outras concretizações, o micro-organismo é cultivado em uma temperatura desde cerca de 32°C até cerca de 33°C. Em outras concretizações, o micro-organismo é cultivado em uma temperatura desde cerca de 33°C até cerca de 34°C. Em outras concretizações, o micro-organismo é

cultivado em uma temperatura desde cerca de 34°C até cerca de 35°C.

[0031] Em algumas concretizações, o micro-organismo é cultivado em um pH desde cerca de 6,6 até cerca de 7,0. Em algumas concretizações, o micro-organismo é cultivado em um pH desde cerca de 6,6 até cerca de 6,7. Em algumas concretizações, o micro-organismo é cultivado em um pH desde cerca de 6,7 até cerca de 6,8. Em algumas concretizações, o micro-organismo é cultivado em um pH desde cerca de 6,8 até cerca de 6,9. Em algumas concretizações, o micro-organismo é cultivado em um pH desde cerca de 6,9 até cerca de 7,0.

[0032] Em algumas concretizações, o método ainda inclui a adição de isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídio 1 mM ao meio de cultura. Em algumas concretizações, o éster etílico de ácido graxo é produzido a uma concentração desde cerca de 1 g/L até cerca de 170 g/L, tal como desde cerca de 1 g/L até cerca de 10 g/L; ou tal como desde cerca de 40 g/L até cerca de 170 g/L; ou tal como desde cerca de 100 g/L até cerca de 170 g/L. Em algumas concretizações, o éster etílico de ácido graxo é produzido a uma concentração desde cerca de 10 g/L até cerca de 100 g/L. Em algumas concretizações, o éster etílico de ácido graxo é produzido a uma concentração desde cerca de 1 g/L até cerca de 40 g/L. Em algumas concretizações, o éster etílico de ácido graxo é produzido a uma concentração desde cerca de 40 g/L até cerca de 100 g/L. Em algumas concretizações, o éster etílico de ácido graxo é produzido a uma concentração desde cerca de 1 g/L até cerca de 100 g/L.

[0033] Em algumas concretizações, o micro-organismo é geneticamente modificado para superexpressar pelo menos um

gene selecionado do grupo consistindo em *pdc*, *adh*, *adhA*, *adhB*, *pdh*, e *casAB*, com relação a um correspondente micro-organismo do tipo selvagem. Em outras concretizações, o micro-organismo é geneticamente modificado para ter expressão reduzida de pelo menos um gene selecionado do grupo consistindo em *frd*, *ldhA*, *pflA*, *pflB*, *adhE*, *ackA*, e *focA*, com relação a um correspondente organismo do tipo selvagem. Em certas concretizações, o micro-organismo é geneticamente modificado para ter expressão reduzida de um gene de lactato desidrogenase, por exemplo, um que é codificante de uma enzima de EC 1.1.1.27. Em algumas concretizações, um ou mais dos genes endógenos de lactato desidrogenase são funcionalmente deletados ou desligados (*knocked-out*). Em concretizações particulares, o gene lactato desidrogenase gene codifica uma D-lactato desidrogenase fermentativa ligada a NAD (por exemplo, Mat-Jan et al., *J. Bacteriol.* 171(1):342-8 (1989); Bunch et al., *Microbiol.* 143(1):187-95 (1997)). Em concretizações adicionais, a lactato desidrogenase é codificada por um gene *ldhA*.

[0034] Em algumas concretizações, o micro-organismo superexpressa um gene codificante de uma tioésterase ou um gene codificante de uma acil-CoA sintase, com relação a um micro-organismo do tipo selvagem. Em outras concretizações, o micro-organismo superexpressa um gene codificante de uma tioésterase e um gene codificante de uma acil-CoA sintase, com relação a um micro-organismo do tipo selvagem. Em algumas concretizações, o gene codificante de uma tioésterase é selecionado do grupo consistindo em *tesA*, *'tesA*, *fatB1*, *fatB2*, *fatB3*, *fatA1*, *atfata* e *fataA*. Em outras concretizações, o gene codificante de uma acil-CoA sintase é *fadD*. Ainda em

outras concretizações, o gene codificante de uma éster sintase é selecionado do grupo consistindo em *atfA1*, *wax-dgat*, e *mWS*.

[0035] Em algumas concretizações, o micro-organismo é uma célula recombinante de *E. coli*. Em certas concretizações, a célula recombinante de *E. coli* inclui uma modificação genética que tem expressão reduzida de um gene regulador da biossíntese de ácido graxo. Em algumas concretizações, um ou mais genes reguladores da biossíntese endógena de ácido graxo são funcionalmente deletados ou desligados. Em certas concretizações, o gene regulador da biossíntese de ácido graxo é um repressor de transcrição, por exemplo, um repressor dos genes de *E. coli* *fabA*, *fabB* and/or *yqfA* (ver, por exemplo, McCue *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 29(3):774-82 (2001); Zhang *et al.*, *J. Biol. Chem.* 277 (18):15558-65 (2002)). Em concretizações particulares, o gene regulador de biossíntese de ácido graxo é *fabR*. Em certas outras concretizações, a célula recombinante de *E. coli* inclui uma modificação genética que tem expressão reduzida de um gene de piruvato oxidase, por exemplo, um gene codificante de uma enzima de EC 1.2.3.3 (ver, por exemplo, Chang *et al.*, *J. Bacteriol.* 154 (2):756-62 (1983); Abdel-Ahmid *et al.*, *Micribiol.* 147 (6):1483-98 (2001)). Em algumas concretizações, um ou mais genes endógenos de piruvato oxidase são funcionalmente deletados ou desligados. Em concretizações particulares, o gene de piruvato oxidase é *poxB*. Em certas outras concretizações, a célula recombinante de *E. coli* inclui uma modificação genética que tem expressão reduzida ou uma deleção funcional de um gene *fadE*.

[0036] Em certas concretizações preferidas, o gene regulador da síntese de ácido graxo é deletado. Em uma concretização alternativa, a célula recombinante de *E. coli* adicionalmente compreende um gene de piruvato oxidase, sendo que o gene de piruvato oxidase tem uma expressão reduzida com relação a uma célula de *E. coli* do tipo selvagem. Em uma concretização, o gene de piruvato oxidase é deletado. Em uma concretização alternativa, a célula recombinante de *E. coli* adicionalmente compreende um gene de lactato desidrogenase, sendo que o gene de lactato desidrogenase tem expressão reduzida com relação a uma célula de *E. coli* do tipo selvagem. Em uma concretização, o lactato desidrogenase é deletado. Em uma concretização alternativa, a célula recombinante de *E. coli* adicionalmente compreende (1) um gene de piruvato oxidase, sendo que o gene de piruvato oxidase tem expressão reduzida com relação a uma célula de *E. coli* do tipo selvagem e (2) um gene de lactato desidrogenase, sendo que o gene de lactato desidrogenase tem expressão reduzida com relação a uma célula de *E. coli* do tipo selvagem.

[0037] Em certas concretizações preferidas, o gene de piruvato oxidase é deletado. Em uma concretização alternativa, a célula recombinante de *E. coli* adicionalmente compreende um gene regulador de síntese de ácido graxo, sendo que o gene regulador da síntese de ácido graxo tem expressão reduzida com relação a uma célula de *E. coli*. Em uma concretização, o gene regulador da síntese de ácido graxo é deletado. Em uma concretização alternativa, a célula recombinante de *E. coli* adicionalmente compreende um gene de lactato desidrogenase, sendo que o gene de lactato

desidrogenase tem expressão reduzida com relação a uma célula de *E. coli* do tipo selvagem. Em uma concretização, o lactato desidrogenase é deletado. Em uma concretização alternativa, a célula recombinante de *E. coli* adicionalmente compreende (1) um gene regulador da síntese de ácido graxo, sendo que o gene regulador da síntese de ácido graxo tem expressão reduzida com relação a uma célula de *E. coli* do tipo selvagem, e (2) um gene de lactato desidrogenase, sendo que o gene de lactato desidrogenase tem expressão reduzida com relação a uma célula de *E. coli* do tipo selvagem.

[0038] Em certas concretizações preferidas, o gene de lactato desidrogenase é deletado. Em uma concretização alternativa, a célula recombinante de *E. coli* adicionalmente compreende um gene de piruvato oxidase, sendo que o gene de piruvato oxidase tem expressão reduzida com relação a uma célula de *E. coli* do tipo selvagem. Em uma concretização, o gene de piruvato oxidase é deletado. Em uma concretização alternativa, a célula recombinante de *E. coli* adicionalmente compreende um gene regulador de síntese de ácido graxo, sendo que o gene regulador de síntese de ácido graxo tem expressão reduzida com relação a uma célula de *E. coli* do tipo selvagem. Em uma concretização, o gene regulador de síntese de ácido graxo é deletado. Em uma concretização alternativa, a célula recombinante de *E. coli* adicionalmente compreende (1) um gene de piruvato oxidase, sendo que o gene de piruvato oxidase tem expressão reduzida com relação a uma célula de *E. coli* do tipo selvagem, e (2) um gene regulador de síntese de ácido graxo, sendo que o gene regulador de síntese de ácido graxo tem expressão reduzida com relação a uma célula de *E. coli* do tipo selvagem.

[0039] Em uma concretização preferida, a célula recombinante de *E. coli* compreende pelo menos uma das seguintes deleções de gene: *poxB*, *ldhA* e/ou *fabR*. Em algumas concretizações, a célula recombinante de *E. coli* inclui uma modificação genética que atenua a expressão de pelo menos um gene selecionado do grupo consistindo em *fadE*, *fabR*, *poxB*, e *ldhA*, com relação a uma célula de *E. coli* do tipo selvagem.

[0040] Em algumas concretizações, o éster de ácido graxo é produzido com um rendimento desde cerca de 0,5 g até cerca de 50 g de éster de ácido graxo por 100 g de glicose no meio de fermentação. Em concretizações particulares, o éster de ácido graxo é produzido com um rendimento desde cerca de 0,5 g até cerca de 40 g de éster de ácido graxo por 100 g de glicose, desde cerca de 0,5 g até cerca de 30 g de éster de ácido graxo por 100 g de glicose, desde cerca de 0,5 g até cerca de 20 g de éster de ácido graxo por 100 g de glicose, desde cerca de 0,5 g até cerca de 10 g de éster de ácido graxo por 100 g de glicose, desde cerca de 0,5 g até cerca de 5 g de éster de ácido graxo por 100 g de glicose, ou desde cerca de 0,5 g até cerca de 4 g de éster de ácido graxo por 100 g de glicose no meio de fermentação. Em concretizações particulares, o éster de ácido graxo é produzido com um rendimento de pelo menos 0,5 g de éster de ácido graxo, pelo menos 4 g de éster de ácido graxo, de pelo menos 5 g de éster de ácido graxo, de pelo menos 10 g de éster de ácido graxo, de pelo menos 20 g de éster de ácido graxo, de pelo menos 30 g de éster de ácido graxo, de pelo menos 40 g de éster de ácido graxo, ou de pelo menos 50 g de éster de ácido graxo por 100 g de glicose no meio de fermentação. Em concretizações particulares, o éster de

ácido graxo é produzido com um rendimento de não mais que 50 g de éster de ácido graxo por 100 g de glicose no meio de fermentação.

[0041] Em algumas concretizações, o éster de ácido graxo é produzido com um rendimento desde cerca de 0,5% até cerca de 50% por massa de glicose no meio de fermentação. Em concretizações particulares, o éster de ácido graxo é produzido com um rendimento desde cerca de 0,5% até cerca de 40%, desde cerca de 0,5% até cerca de 30%, desde cerca de 0,5% até cerca de 20%, desde cerca de 0,5% até cerca de 10%, desde cerca de 0,5% até cerca de 5%, ou desde cerca de 0,5% até cerca de 4% por massa da glicose no meio de fermentação. Em concretizações particulares, o éster de ácido graxo é produzido com um rendimento de pelo menos cerca de 0,5%, pelo menos cerca de 4%, pelo menos cerca de 5%, pelo menos cerca de 10%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 40%, ou pelo menos cerca de 50% por massa de glicose no meio de fermentação. Em concretizações particulares, o éster de ácido graxo é produzido com um rendimento de não mais do que 50% por massa de glicose no meio de fermentação.

[0042] Em algumas concretizações, o éster de ácido graxo é produzido com um rendimento desde cerca de 10% até cerca de 95% por massa de carbono na fonte de carbono presente no meio de fermentação. Em concretizações particulares, o éster de ácido graxo é produzido com um rendimento desde cerca de 15% até cerca de 90%, desde cerca de 20% até cerca de 80%, ou desde cerca de 30% até cerca de 70% por massa de carbono na fonte de carbono presente no meio de fermentação. Em concretizações particulares, o éster

de ácido graxo é produzido com um rendimento de pelo menos cerca de 10%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 90%, ou pelo menos cerca de 95% por massa de carbono na fonte de carbono presente no meio de fermentação. Em concretizações particulares, o éster de ácido graxo é produzido com um rendimento de não mais do que 95% por massa de carbono na fonte de carbono presente no meio de fermentação.

[0043] Em algumas concretizações, o éster etílico de ácido graxo é produzido com um rendimento desde cerca de 0,5 g até cerca de 50 g de éster etílico de ácido graxo por 100 g de glicose no meio de fermentação. Em concretizações particulares, o éster etílico de ácido graxo é produzido com um rendimento desde cerca de 0,5 g até cerca de 40 g de éster etílico de ácido graxo por 100 g de glicose, desde cerca de 0,5 g até cerca de 30 g de éster etílico de ácido graxo por 100 g de glicose, desde cerca de 0,5 g até cerca de 20 g de éster etílico de ácido graxo por 100 g de glicose, desde cerca de 0,5 g até cerca de 10 g de éster etílico de ácido graxo por 100 g de glicose, desde cerca de 0,5 g até cerca de 5 g de éster etílico de ácido graxo por 100 g de glicose, ou desde cerca de 0,5 g até cerca de 4 g de éster etílico de ácido graxo por 100 g de glicose no meio de fermentação. Em concretizações particulares, o éster etílico de ácido graxo é produzido com um rendimento de pelo menos cerca de 0,5 g de éster etílico de ácido graxo, de pelo menos 4 g de éster etílico de ácido graxo, de pelo menos 5 g de éster etílico de ácido graxo, de pelo menos 10 g de éster etílico de ácido

graxo, de pelo menos 20 g de éster etílico de ácido graxo, de pelo menos 30 g de éster etílico de ácido graxo, de pelo menos 40 g de éster etílico de ácido graxo, ou de pelo menos 50 g de éster etílico de ácido graxo por 100 g de glicose no meio de fermentação. Em concretizações particulares, o éster etílico de ácido graxo é produzido com um rendimento de não mais que 50 g de éster etílico de ácido graxo por 100 g de glicose no meio de fermentação.

[0044] Em algumas concretizações, o éster etílico de ácido graxo é produzido com um rendimento desde cerca de 0,5 % até cerca de 50% por massa de glicose no meio de fermentação. Em concretizações particulares, o éster etílico de ácido graxo é produzido com um rendimento desde cerca de 0,5 % até cerca de 40 %, desde cerca de 0,5 % até cerca de 30 %, desde cerca de 0,5 % até cerca de 20 %, desde cerca de 0,5 % até cerca de 10%, desde cerca de 0,5 % até cerca de 5 %, ou desde cerca de 0,5 % até cerca de 4 % por massa de glicose no meio de fermentação. Em concretizações particulares, o éster etílico de ácido graxo é produzido com um rendimento de pelo menos cerca de 0,5 %, de pelo menos cerca de 4 %, de pelo menos cerca de 5 %, de pelo menos cerca de 10 %, de pelo menos cerca de 20 %, de pelo menos cerca de 30 %, de pelo menos cerca de 40 %, ou de pelo menos cerca de 50 % por massa de glicose no meio de fermentação. Em concretizações particulares, o éster etílico de ácido graxo é produzido com um rendimento de não menos que 50 % por massa de glicose no meio de fermentação.

[0045] Em algumas concretizações, o éster etílico de ácido graxo é produzido com um rendimento desde cerca de 10 % até cerca de 95 % por massa de carbono na fonte de carbono

presente no meio de fermentação. Em concretizações particulares, o éster etílico de ácido graxo é produzido com um rendimento desde cerca de 15 % até cerca de 90 %, desde cerca de 20 % até cerca de 80 %, ou desde cerca de 30% até cerca de 70% por massa de carbono na fonte de carbono presente no meio de fermentação. Em concretizações particulares, o éster etílico de ácido graxo é produzido com um rendimento de pelo menos cerca de 10%, de pelo menos cerca de 20%, de pelo menos cerca de 30%, de pelo menos cerca de 40%, de pelo menos cerca de 50%, de pelo menos cerca de 60%, de pelo menos cerca de 70%, de pelo menos cerca de 80%, de pelo menos cerca de 90%, ou de pelo menos cerca de 95% por massa de carbono na fonte de carbono presente no meio de fermentação. Em concretizações particulares, o éster etílico de ácido graxo é produzido com um rendimento de não mais que 95% por massa de carbono na fonte de carbono presente no meio de fermentação.

[0046] Em algumas concretizações, o éster de ácido graxo é um éster metílico de ácido graxo.

[0047] Em algumas concretizações, o éster metílico de ácido graxo é produzido com um rendimento desde cerca de 0,5 g até cerca de 50 g de éster metílico de ácido graxo por 100 g de glicose no meio de fermentação. Em algumas concretizações, o éster metílico de ácido graxo é produzido com um rendimento desde cerca de 0,5 g até cerca de 40 g de éster metílico de ácido graxo por 100 g de glicose, desde cerca de 0,5 g até cerca de 30 g de éster metílico de ácido graxo por 100 g de glicose, desde cerca de 0,5 g até cerca de 20 g de éster metílico de ácido graxo por 100 g de glicose, desde cerca de 0,5 g até cerca de 10 g de éster metílico de

ácido graxo por 100 g de glicose, desde cerca de 0,5 g até cerca de 5 g de éster metílico de ácido graxo por 100 g de glicose, ou desde cerca de 0,5 g até cerca de 4 g de éster metílico de ácido graxo por 100 g de glicose no meio de fermentação. Em concretizações particulares, o éster metílico de ácido graxo é produzido com um rendimento de pelo menos 0,5 g de éster metílico de ácido graxo, de pelo menos 4 g de éster de ácido graxo, de pelo menos 5 g de éster metílico de ácido graxo, de pelo menos 10 g de éster metílico de ácido graxo, de pelo menos 20 g de éster metílico de ácido graxo, de pelo menos 30 g de éster metílico de ácido graxo, de pelo menos 40 g de éster metílico de ácido graxo, ou de pelo menos 50 g de éster metílico de ácido graxo por 100 g de glicose no meio de fermentação. Em concretizações particulares, o éster metílico de ácido graxo é produzido com um rendimento de não mais que 50 g de éster metílico de ácido graxo por 100 g de glicose no meio de fermentação.

[0048] Em algumas concretizações, o éster metílico de ácido graxo é produzido com um rendimento desde cerca de 0,5% até cerca de 50% em massa da glicose presente no meio de fermentação. Em concretizações particulares, o éster metílico de ácido graxo é produzido com um rendimento desde cerca de 0,5% até cerca de 40%, desde cerca de 0,5% até cerca de 30%, desde cerca de 0,5% até cerca de 20%, desde cerca de 0,5% até cerca de 10%, desde cerca de 0,5% até cerca de 5%, ou desde cerca de 0,5% até cerca de 4% por massa de glicose no meio de fermentação. Em concretizações particulares, o éster metílico de ácido graxo é produzido com um rendimento de pelo menos cerca de 0,5%, de pelo menos cerca de 4%, de pelo menos cerca de 5%, de pelo menos cerca de 10%, de pelo

menos cerca de 20%, de pelo menos cerca de 30%, de pelo menos cerca de 40%, ou de pelo menos cerca de 50% por massa de glicose no meio de fermentação. Em concretizações particulares, o éster metílico de ácido graxo é produzido com um rendimento de não mais do que 50% por massa de glicose no meio de fermentação.

[0049] Em algumas concretizações, o éster metílico de ácido graxo é produzido com um rendimento de cerca de 10% até cerca de 95% por massa de carbono na fonte de carbono presente no meio de fermentação. Em concretizações particulares, o éster metílico de ácido graxo é produzido com um rendimento desde cerca de 15% até cerca de 90%, desde cerca de 20% até cerca de 80%, ou desde cerca de 30% até cerca de 70% por massa de carbono na fonte de carbono presente no meio de fermentação. Em concretizações particulares, o éster metílico de ácido graxo é produzido com um rendimento de pelo menos cerca de 10%, de pelo menos cerca de 20%, de pelo menos cerca de 30%, de pelo menos cerca de 40%, de pelo menos cerca de 50%, de pelo menos cerca de 60%, de pelo menos cerca de 70%, de pelo menos cerca de 80%, de pelo menos cerca de 90%, ou de pelo menos cerca de 95% por massa de carbono na fonte de carbono presente no meio de fermentação. Em concretizações particulares, o éster metílico de ácido graxo é produzido com um rendimento de não mais do que 95% por massa de carbono na fonte de carbono presente no meio de fermentação.

[0050] Em outro aspecto, a invenção representa um éster de ácido graxo produzido por um método da presente descrição. Em algumas concretizações, o éster de ácido graxo é um éster etílico de ácido graxo. Em algumas concretizações,

o éster etílico de ácido graxo tem um comprimento de pelo menos cerca de 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, ou 18 carbonos.

[0051] Em algumas concretizações, o éster etílico de ácido graxo compreende um lado A e um lado B. Em algumas concretizações, o lado B do éster etílico de ácido graxo inclui uma cadeia reta. Em algumas concretizações, o lado B do éster etílico de ácido graxo inclui uma cadeia ramificada. Ainda em outras concretizações, o lado B do éster etílico de ácido graxo compreende pelo menos um componente cíclico.

[0052] Em algumas concretizações, o éster etílico de ácido graxo é saturado. Em outras concretizações, o éster etílico de ácido graxo é insaturado. Em outras concretizações, o éster etílico de ácido graxo é monoinsaturado.

[0053] Em outro aspecto, a invenção representa um método para produzir um éster etílico de ácido graxo pelo cultivo de um micro-organismo geneticamente modificado na ausência de álcool exógeno, sendo que o micro-organismo é geneticamente modificado para produzir um ácido graxo e pelo menos uma éster sintase.

[0054] Em algumas concretizações, o micro-organismo é geneticamente modificado para produzir etanol. Em algumas concretizações, o micro-organismo é geneticamente modificado para superexpressar pelo menos um gene selecionado do grupo consistindo em *pdc*, *adh*, *adhA*, *adhB*, *pdh*, e *casAB*, com relação a um micro-organismo do tipo selvagem. Em outras concretizações, o micro-organismo é geneticamente modificado para ter expressão reduzida de pelo menos um gene selecionado do grupo consistindo em *frd*, *ldhA*, *pflA*, *pflB*, *adhE*, *ackA*, e *focA*, com relação a um micro-organismo do tipo selvagem.

Em certas concretizações, o micro-organismo é geneticamente modificado para ter expressão reduzida de um gene de lactato desidrogenase, por exemplo, um codificante de uma enzima de EC 1.1.1.27. Em algumas concretizações, um ou mais genes endógenos de lactato desidrogenase são funcionalmente deletados ou desligados (*knocked out*). Em concretizações particulares, o gene de lactato desidrogenase codifica uma D-lactato desidrogenase fermentativa ligada-a-NAD. Em concretizações adicionais, a lactato desidrogenase é codificada por um gene *ldhA*.

[0055] Em algumas concretizações, o método adicionalmente inclui o isolamento do éster etílico de ácido graxo. Em outras concretizações, o método ainda inclui o monitoramento do nível da fonte de carbono no meio de cultura. Em algumas concretizações, o método ainda inclui a adição de isopropil β -D-1-tiogalactopiranosideo 1 mM ao meio de cultura.

[0056] Em algumas concretizações, o micro-organismo é cultivado em um meio de cultura compreendendo uma concentração inicial desde cerca de 2 g/L até cerca de 50 g/L de uma fonte de carbono. Em algumas concretizações, o micro-organismo é cultivado em um meio de cultura compreendendo uma concentração inicial desde cerca de 2 g/L até cerca de 10 g/L de uma fonte de carbono. Em algumas concretizações, o micro-organismo é cultivado em um meio de cultura compreendendo uma concentração inicial desde cerca de 10 g/L até cerca de 20 g/L de uma fonte de carbono. Em algumas concretizações, o micro-organismo é cultivado em um meio de cultura compreendendo uma concentração inicial desde cerca de 20 g/L até cerca de 30 g/L de uma fonte de carbono.

Em algumas concretizações, o micro-organismo é cultivado em um meio de cultura compreendendo uma concentração inicial desde cerca de 30 g/L até cerca de 40 g/L de uma fonte de carbono. Em algumas concretizações, o micro-organismo é cultivado em um meio de cultura compreendendo uma concentração inicial desde cerca de 40 g/L até cerca de 50 g/L de uma fonte de carbono.

[0057] Em algumas concretizações, o método inclui a adição de uma fonte de carbono suplementar ao meio de cultura quando o nível da fonte de carbono no meio é menor que cerca de 0,5 g/L. Em algumas concretizações, o método inclui a adição de uma fonte de carbono suplementar ao meio de cultura quando o nível da fonte de carbono no meio é menor que cerca de 0,4 g/L. Em algumas concretizações, o método inclui a adição de uma fonte de carbono suplementar ao meio de cultura quando o nível da fonte de carbono no meio é menor que cerca de 0,3 g/L. Em algumas concretizações, o método inclui a adição de uma fonte de carbono suplementar ao meio de cultura quando o nível da fonte de carbono no meio é menor que cerca de 0,2 g/L. Em algumas concretizações, o método inclui a adição de uma fonte de carbono suplementar ao meio de cultura quando o nível da fonte de carbono no meio é menor que cerca de 0,1 g/L.

[0058] Em algumas concretizações, a fonte de carbono suplementar é adicionada para manter uma concentração de fonte de carbono desde cerca de 2 g/L até cerca de 5 g/L. Em algumas concretizações, a fonte de carbono suplementar é adicionada para manter uma concentração de fonte de carbono desde cerca de 2 g/L até cerca de 3 g/L. Em algumas concretizações, a fonte de carbono suplementar é adicionada

para manter uma concentração de fonte de carbono desde cerca de 3 g/L até cerca de 4 g/L. Em algumas concretizações, a fonte de carbono suplementar é adicionada para manter uma concentração de fonte de carbono desde cerca de 4 g/L até cerca de 5 g/L.

[0059] Em algumas concretizações, a fonte de carbono é glicose.

[0060] Em algumas concretizações, o micro-organismo é cultivado em condições aeróbias. Em algumas concretizações, as condições aeróbias compreendem desde cerca de 10% até cerca de 50% de oxigênio dissolvido. Em algumas concretizações, as condições aeróbias compreendem desde cerca de 10% até cerca de 20% de oxigênio dissolvido. Em algumas concretizações, as condições aeróbias compreendem desde cerca de 20% até cerca de 30% de oxigênio dissolvido. Em algumas concretizações, as condições aeróbias compreendem desde cerca de 30% até cerca de 40% de oxigênio dissolvido. Em algumas concretizações, as condições aeróbias compreendem desde cerca de 40% até cerca de 50% de oxigênio dissolvido.

[0061] Em algumas concretizações, o micro-organismo é cultivado em uma temperatura desde cerca de 30°C até cerca de 35°C. Em algumas concretizações, o micro-organismo é cultivado em uma temperatura desde cerca de 30°C até cerca de 31°C. Em algumas concretizações, o micro-organismo é cultivado em uma temperatura desde cerca de 31°C até cerca de 32°C. Em algumas concretizações, o micro-organismo é cultivado em uma temperatura desde cerca de 32°C até cerca de 33°C. Em algumas concretizações, o micro-organismo é cultivado em uma temperatura desde cerca de 33°C até cerca de 34°C. Em algumas concretizações, o micro-organismo é

cultivado em uma temperatura desde cerca de 34°C até cerca de 35°C.

[0062] Em outras concretizações, o micro-organismo é cultivado a um pH desde cerca de 6,6 até cerca de 7,0. Em algumas concretizações, o micro-organismo é cultivado a um pH desde cerca de 6,6 até cerca de 6,7. Em algumas concretizações, o micro-organismo é cultivado a um pH desde cerca de 6,7 até cerca de 6,8. Em algumas concretizações, o micro-organismo é cultivado a um pH desde cerca de 6,8 até cerca de 6,9. Em algumas concretizações, o micro-organismo é cultivado a um pH desde cerca de 6,9 até cerca de 7,0.

[0063] Em algumas concretizações, o éster etílico de ácido graxo é produzido a uma concentração desde cerca de 1 g/L até cerca de 170 g/L, tal como desde cerca de 1 g/L até cerca de 10 g/L; ou tal como desde cerca de 40 g/L até cerca de 170 g/L; ou tal como desde cerca de 100 g/L até cerca de 170 g/L. Em algumas concretizações, o éster etílico de ácido graxo é produzido a uma concentração desde cerca de 10 g/L até cerca de 100 g/L. Em algumas concretizações, o éster etílico de ácido graxo é produzido a uma concentração desde cerca de 1 g/L até cerca de 40 g/L. Em algumas concretizações, o éster etílico de ácido graxo é produzido a uma concentração desde cerca de 40 g/L até cerca de 100 g/L. Em algumas concretizações, o éster etílico de ácido graxo é produzido a uma concentração desde cerca de 1 g/L até cerca de 100 g/L.

[0064] Em algumas concretizações, o micro-organismo é geneticamente modificado para superexpressar um gene codificante de uma tioésterase ou um gene codificante de uma acil-CoA sintase, com relação a um micro-organismo do tipo

selvagem. Em outras concretizações, o micro-organismo é geneticamente modificado para superexpressar um gene codificante de uma tioésterase e um gene codificante de uma acil-CoA sintase, com relação a um micro-organismo do tipo selvagem. Em algumas concretizações, o gene codificante de uma tioésterase é selecionado do grupo consistindo em *tesA*, '*tesA*, *fatB1*, *fatB2*, *fatB3*, *fatA1*, *atfata*, e *fatA*. Em outras concretizações, o gene codificante de uma tioésterase é '*tesA*. Em algumas concretizações, o gene codificante de uma acil-CoA sintase é *fadD*. Em outras concretizações, o gene codificante de uma éster sintase é selecionado do grupo consistindo em *atfA1*, *wax-dgat* e *mWS*. Em outras concretizações, o gene codificante de uma éster sintase é *atfA1*.

[0065] Em algumas concretizações, o micro-organismo é uma célula recombinante de *E. coli*. Em certas concretizações, a célula recombinante de *E. coli* inclui uma modificação genética que tem reduzida expressão de um gene regulador da biossíntese de ácido graxo. Em algumas concretizações, um ou mais genes endógenos reguladores da biossíntese de ácido graxo são deletados ou desligados. Em certas concretizações, o gene regulador da biossíntese de ácido graxo é um repressor de transcrição, por exemplo, um repressor dos genes de *E. coli* *fabA*, *fabB* e/ou *yqfA*. Em concretizações particulares, o gene regulador da biossíntese de ácido graxo é *fabR*. Em certas outras concretizações, a célula recombinante de *E. coli* inclui uma modificação genética que tem reduzida expressão de um gene de piruvato oxidase, por exemplo, um codificante de uma enzima de EC 1.2.3.3. Em algumas concretizações, um ou mais genes

endógenos de piruvato oxidase são funcionalmente deletados ou desligados. Em concretizações particulares, o gene de piruvato oxidase é *poxB*. Em certas outras concretizações, a célula recombinante de *E. coli* inclui uma modificação genética que tem reduzida expressão ou uma deleção funcional de um gene *fadE*. Em outras concretizações, a célula recombinante de *E. coli* inclui uma modificação genética que atenua a expressão de pelo menos um gene selecionado do grupo consistindo em *fadE*, *fabR*, *poxB*, e *ldhA*, com relação a uma célula de *E. coli* do tipo selvagem.

[0066] Em certas concretizações preferidas, o gene regulador de síntese de ácido graxo é deletado. Em uma concretização alternativa, o micro-organismo ainda compreende um gene de piruvato oxidase, sendo que o gene de piruvato oxidase tem expressão reduzida com relação a um micro-organismo do tipo selvagem. Em uma concretização, o gene de piruvato oxidase é deletado. Em uma concretização alternativa, o micro-organismo ainda compreende um gene de lactato desidrogenase, sendo que o gene de lactato desidrogenase tem reduzida expressão com relação a um micro-organismo do tipo selvagem. Em uma concretização, o lactato desidrogenase é deletado. Em uma concretização alternativa, o micro-organismo ainda compreende (1) um gene de piruvato oxidase, sendo que o gene de piruvato oxidase tem reduzida expressão com relação a um micro-organismo do tipo selvagem, e (2) um gene de lactato desidrogenase, sendo que o gene de lactato desidrogenase tem reduzida expressão com relação a um micro-organismo do tipo selvagem.

[0067] Em certas concretizações preferidas, o gene de piruvato oxidase é deletado. Em uma concretização

alternativa, o micro-organismo ainda compreende um gene regulador de síntese de ácido graxo, sendo que o gene regulador de síntese de ácido graxo tem reduzida expressão com relação a um micro-organismo do tipo selvagem. Em uma concretização, o gene regulador de síntese de ácido graxo é deletado. Em uma concretização alternativa, o micro-organismo ainda compreende um gene de lactato desidrogenase, sendo que o gene de lactato desidrogenase tem reduzida expressão com relação a um micro-organismo do tipo selvagem. Em uma concretização, o lactato desidrogenase é deletado. Em uma concretização alternativa, o micro-organismo ainda compreende (1) um gene regulador de síntese de ácido graxo, sendo que o gene regulador de síntese de ácido graxo tem reduzida expressão com relação a um micro-organismo do tipo selvagem, e (2) um gene de lactato desidrogenase, sendo que o gene da lactato desidrogenase tme reduzida expressão com relação a um micro-organismo do tipo selvagem.

[0068] Em certas concretizações preferidas, o gene de lactato desidrogenase é deletado. Em uma concretização alternativa, o micro-organismo ainda compreende um gene de piruvato oxidase, sendo que o gene de piruvato oxidase tem uma expressão reduzida com relação a um micro-organismo do tipo selvagem. Em uma concretização, o gene de piruvato oxidase é deletado. Em uma concretização alternativa, o micro-organismo adicionalmente compreende um gene regulador da síntese de ácido graxo, sendo que o gene regulador da síntese de ácido graxo tem expressão reduzida com relação a um micro-organismo do tipo selvagem. Em uma concretização, o gene regulador da síntese de ácido graxo é deletado. Em uma concretização alternativa, o micro-organismo compreende

(1) um gene de piruvato oxidase, sendo que o gene de piruvato oxidase tem expressão reduzida com relação a um micro-organismo do tipo selvagem, e (2) um gene regulador da síntese de ácido graxo, sendo que o gene regulador da síntese de ácido graxo tem expressão reduzida com relação a um micro-organismo do tipo selvagem.

[0069] Em uma concretização preferida, o micro-organismo compreende pelo menos uma das seguintes deleções: *poxB*, *ldhA* e/ou *fabR*.

[0070] Em outro aspecto, a invenção representa um éster etílico de ácido graxo produzido por um método acima descrito. Em algumas concretizações, o éster etílico de ácido graxo inclui um lado A e um lado B. Em algumas concretizações, o lado B do éster etílico de ácido graxo tem um comprimento de pelo menos cerca de 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, ou 18 carbonos.

[0071] Em algumas concretizações, o lado B do éster etílico de ácido graxo compreende uma cadeia reta. Em outras concretizações, o lado B do éster etílico de ácido graxo compreende uma cadeia ramificada. Ainda em outras concretizações, o lado B do éster etílico de ácido graxo compreende pelo menos um componente cíclico.

[0072] Em algumas concretizações, o éster etílico de ácido graxo é saturado. Em outras concretizações, o éster etílico de ácido graxo é insaturado. Ainda em outras concretizações, o éster etílico de ácido graxo é monoinsaturado.

[0073] Em algumas concretizações, a invenção representa um método para produzir, por meio de uma célula hospedeira, um álcool, um ácido graxo e pelo menos uma éster

sintase. Em algumas concretizações, o método compreende a expressão, na célula hospedeira, de um vetor recombinante compreendendo pelo menos um gene selecionado do grupo consistindo em *pdc*, *adh*, *adhA*, *adhB*, *pdh* e *casAB*. Em algumas concretizações, o método ainda inclui isolar ésteres de ácido graxo a partir da célula hospedeira. Em outras concretizações, o álcool é etanol. Ainda em outras concretizações, o éster de ácido graxo é um éster etílico de ácido graxo.

[0074] Em algumas concretizações, o vetor recombinante ainda compreende um promotor operacionalmente ligado à sequência de nucleotídeos. Em certas concretizações, o promotor é um promotor regulado pelo desenvolvimento, um específico de organela, um específico de tecido, um induzível, um constitutivo, ou um específico de célula. Em algumas concretizações, o vetor recombinante compreende pelo menos uma sequência selecionada do grupo consistindo em (a) uma sequência de regulação operacionalmente acoplada à sequência de nucleotídeos; (b) um marcador de seleção operacionalmente acoplado à sequência de nucleotídeos; (c) uma sequência de marcador operacionalmente acoplada à sequência de nucleotídeos; (d) um componente de purificação operacionalmente acoplado à sequência de nucleotídeos; (e) uma sequência de secreção operacionalmente acoplada à sequência de nucleotídeos; e (f) uma sequência de direcionamento operacionalmente acoplada à sequência de nucleotídeos.

[0075] Em certas concretizações, o vetor recombinante é um plasmídeo.

[0076] Em algumas concretizações, a célula hospedeira expressa um polipeptídeo, tal como, por exemplo, um polipeptídeo Pdc, Adh, AdhA, AdhB, Pdh, ou CasAB, codificado pelo vetor recombinante. Em algumas concretizações, a sequência de nucleotídeos é estavelmente incorporada no DNA genômico da célula hospedeira, e a expressão da sequência de nucleotídeos está sob o controle do promotor de regulação.

[0077] Em algumas concretizações, o método ainda compreende a modificação de expressão de um ou mais genes selecionados do grupo consistindo em *frd*, *ldhA*, *pflA*, *pflB*, *adhE*, *ackA* e *focA*. Em certas concretizações, modificar a expressão de tal gene inclui expressá-lo e/ou aumentar a expressão ou atividade dele na célula hospedeira. Em concretizações alternativas, modificar a expressão de tal gene inclui atenuar tal gene ou diminuir a expressão ou atividade de tal gene na célula hospedeira. Em certas concretizações, modificar a expressão de tal gene inclui deletar ou desligar o gene na célula hospedeira. Em concretizações particulares, o método compreende modificar a expressão de um gene de lactato desidrogenase, por exemplo, um codificante de uma enzima EC 1.1.1.27. Em certas concretizações, a expressão de lactato desidrogenase é reduzida. Em algumas concretizações, um ou mais genes endógenos de lactato desidrogenase são funcionalmente deletados ou desligados. Em certas concretizações, o gene de lactato desidrogenase codifica uma D-lactato desidrogenase fermentativa ligada a NAD. Em concretizações adicionais, a lactato desidrogenase é codificada por um gene *ldhA*.

[0078] Em outro aspecto, a invenção representa um micro-organismo geneticamente modificado que produz um álcool, um ácido graxo e pelo menos uma éster sintase. Em algumas concretizações, o micro-organismo é modificado para superexpressar pelo menos um gene selecionado do grupo consistindo em *pdh*, *adh*, *adhA*, *adhB*, *pdh*, e *casAB*, com relação a um correspondente micro-organismo do tipo selvagem. Em outras concretizações, o micro-organismo é geneticamente modificado para ter expressão reduzida de pelo menos um gene selecionado do grupo consistindo em *frd*, *ldhA*, *pflA*, *pflB*, *adhE*, *ackA*, e *focA*, com relação a um correspondente micro-organismo do tipo selvagem.

[0079] Em certas concretizações, o micro-organismo geneticamente modificado compreende uma sequência exógena de controle estavelmente incorporada no DNA genômico do micro-organismo acima de um gene selecionado do grupo consistindo em *pdh*, *adh*, *adhA*, *adhB*, *pdh*, e *casAB*, sendo que o micro-organismo produz um nível aumentado de um álcool com relação a um micro-organismo do tipo selvagem. Em certas concretizações, o micro-organismo produz um nível aumentado de etanol com relação a um micro-organismo do tipo selvagem. Em concretizações adicionais, o micro-organismo ainda produz um nível aumentado de éster de ácido graxo com relação a um micro-organismo do tipo selvagem. Ainda em outras concretizações, o micro-organismo produz um nível aumentado de um éster etílico de ácido graxo com relação a um micro-organismo do tipo selvagem.

[0080] Em algumas concretizações, o micro-organismo superexpressa um gene codificante de uma tioésterase ou um gene codificante de uma acil-CoA sintase, com relação a um

micro-organismo do tipo selvagem. Em outras concretizações, o micro-organismo superexpressa um gene codificante de uma tioésterase e um gene codificante de uma acil-CoA sintase, com relação a um micro-organismo do tipo selvagem. Em algumas concretizações, o gene codificante de uma tioésterase é selecionado do grupo consistindo em *tesA*, *'tesA*, *fatB1*, *fatB2*, *fatB3*, *fatA1*, *atfata* e *fataA*. Em outras concretizações, o gene codificante de uma acil-CoA sintase é *fadD*. Ainda em outras concretizações, o gene codificante de uma éster sintase é selecionado do grupo consistindo em *atfA1*, *wax-dgat*, e *mWS*.

[0081] Em algumas concretizações, o micro-organismo é uma célula de *E. coli* recombinante. Em certas concretizações, o micro-organismo é uma cepa B, cepa C, cepa K ou cepa W de *E. coli*. Em certas concretizações, a célula recombinante de *E. coli* inclui uma modificação genética que tem expressão reduzida de um gene de regulação da biossíntese de ácido graxo. Em algumas concretizações, um ou mais genes endógenos de biossíntese de ácido graxo são funcionalmente deletados ou desligados. Em certas concretizações, o gene de regulação da biossíntese de ácido graxo é um repressor de transcrição, por exemplo, um repressor dos genes de *E. coli* *fabA*, *fabB* e/ou *yqfA*. Em concretizações particulares, o gene de regulação da biossíntese de ácido graxo é *fabR*. Em certas outras concretizações, a célula recombinante de *E. coli* inclui uma modificação genética que tem expressão reduzida de um gene de piruvato oxidase, por exemplo, um gene codificante de uma enzima de EC 1.2.3.3. Em algumas concretizações, um ou mais genes endógenos de piruvato oxidase são deletados ou desligados. Em concretizações

particulares, o gene de piruvato oxidase é *poxB*. Em certas outras concretizações, a célula recombinante de *E. coli* inclui uma modificação genética que tem expressão reduzida ou uma deleção funcional de um gene *fadE*. Em algumas concretizações, a célula recombinante de *E. coli* inclui uma modificação genética que atenua a expressão de pelo menos um gene selecionado do grupo consistindo em *fadE*, *fabR*, *poxB*, e *ldhA*, com relação a uma célula de *E. coli* do tipo selvagem.

[0082] Em certas concretizações preferidas, o gene de regulação da síntese de ácido graxo é deletado. Em uma concretização alternativa, o micro-organismo ainda compreende um gene de piruvato oxidase, sendo que o gene de piruvato oxidase tem expressão reduzida com relação a um micro-organismo do tipo selvagem. Em uma concretização, o gene de piruvato oxidase é deletado. Em uma concretização alternativa, o micro-organismo ainda compreende um gene de lactato desidrogenase, sendo que o gene de lactato desidrogenase tem expressão reduzida com relação a um micro-organismo do tipo selvagem. Em uma concretização, o lactato desidrogenase é deletado. Em uma concretização alternativa, o micro-organismo ainda compreende (1) um gene de piruvato oxidase, sendo que o gene de piruvato oxidase tem expressão reduzida com relação a um micro-organismo do tipo selvagem, e (2) um gene de lactato desidrogenase, sendo que o gene de lactato desidrogenase tem expressão reduzida com relação a um micro-organismo do tipo selvagem.

[0083] Em certas concretizações preferidas, o gene de piruvato oxidase é deletado. Em uma concretização alternativa, o micro-organismo ainda compreende um gene regulador de síntese de ácido graxo, sendo que o gene

regulador de síntese de ácido graxo tem expressão reduzida com relação a um micro-organismo do tipo selvagem. Em uma concretização, o gene regulador de síntese de ácido graxo é deletado. Em uma concretização alternativa, o micro-organismo ainda compreende um gene de lactato desidrogenase, sendo que o gene de lactato desidrogenase tem expressão reduzida com relação a um micro-organismo do tipo selvagem. Em uma concretização, o lactato desidrogenase é deletado. Em uma concretização alternativa, o micro-organismo ainda compreende (1) um gene regulador de síntese de ácido graxo, sendo que o gene regulador de síntese de ácido graxo tem expressão reduzida com relação a um micro-organismo do tipo selvagem, e (2) um gene de lactato desidrogenase, sendo que o gene de lactato desidrogenase tem expressão reduzida com relação a um micro-organismo do tipo selvagem.

[0084] Em certas concretizações preferidas, o gene de lactato desidrogenase é deletado. Em uma concretização alternativa, o micro-organismo adicionalmente compreende um gene de piruvato oxidase, sendo que o gene de piruvato oxidase tem expressão reduzida com relação a um micro-organismo do tipo selvagem. Em uma concretização, o gene de piruvato oxidase é deletado. Em uma concretização alternativa, o micro-organismo adicionalmente compreende um gene de regulação de síntese de ácido graxo, sendo que o gene de regulação de síntese de ácido graxo tem expressão reduzida com relação a um micro-organismo do tipo selvagem. Em uma concretização, o gene de regulação de síntese de ácido graxo é deletado. Em uma concretização alternativa, o micro-organismo adicionalmente compreende (1) um gene de piruvato oxidase, sendo que o gene de piruvato oxidase tem expressão

reduzida com relação a um micro-organismo do tipo selvagem, e (2) um gene regulador de síntese de ácido graxo, sendo que o gene regulador de síntese de ácido graxo tem expressão reduzida com relação a um micro-organismo do tipo selvagem.

[0085] Em uma concretização preferida, o micro-organismo geneticamente modificado compreende pelo menos uma das seguintes deleções: *poxB*, *ldhA*, e/ou *fabR*.

[0086] Em algumas concretizações, o micro-organismo é uma bactéria. Em certas concretizações a bactéria é uma bactéria Gram-negativa ou uma bactéria Gram-positiva. Em algumas concretizações, o micro-organismo é uma micobactéria selecionada do grupo consistindo em *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium marinum*, e *Mycobacterium ulcerans*. Em certas concretizações, o micro-organismo é uma cianobactéria, incluindo, por exemplo, *Synechococcus* sp. PCC 7002, *Synechococcus elongatus* PCC 7942, ou *Synechocystis* sp. PCC6803. Em algumas concretizações, o micro-organismo é uma levedura, incluindo uma levedura oleaginosa, tal como, por exemplo, uma *Yarrowia*, uma *Candida*, uma *Rhodotorula*, uma *Rhodospiridium*, uma *Cryptococcus*, uma *Trichosporon*, ou uma *Lypomyces*.

[0087] Em outras concretizações, o micro-organismo é uma bactéria verde-enxofre, uma bactéria verde-não-enxofre, bactéria púrpura enxofre, bactéria púrpura não-enxofre, extremófila ou um organismo sintético. Em algumas concretizações, o micro-organismo do tipo selvagem e/ou o modificado pode ser um que é dependente de luz ou que fixa carbono. Em outras concretizações, o micro-organismo do tipo

selvagem e/ou o modificado tem atividade autotrófica, tal como, por exemplo, atividade fotoautotrófica na presença de luz. Em algumas concretizações, o micro-organismo do tipo selvagem e/ou o modificado é heterotrófico ou mixotrófico na ausência de luz. Em algumas concretizações, o micro-organismo é selecionado de *Arabidopsis thaliana*, *Panicum virgatum*, *Miscanthus giganteus*, *Zea mays*, *Botryococcus braunii*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Dunaliella salina*, *Synechococcus* sp. PCC7002, *Synechococcus elongatus* PCC7942, *Synechocystis* sp. PCC 6803, *thermosynechococcus elongatus* BP-1, *Chlorobium tepidum*, *Chloroflexus auranticus*, *Chromatium vinosum*, *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium thermocellum*, *Penicillium chrysogenum*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pseudomonas fluorescens*, ou *Zymomonas mobilis*.

[0088] Em outro aspecto, a invenção representa um éster de ácido graxo produzido por qualquer um dos métodos ou qualquer um dos micro-organismos aqui descritos, ou um biocombustível ou composição de tensoativo compreendendo um éster de ácido graxo produzido por qualquer um dos métodos ou qualquer um dos micro-organismos aqui descritos.

[0089] Em outro aspecto, a invenção representa um micro-organismo geneticamente modificado compreendendo um gene de regulação de síntese de ácido graxo, sendo que o gene de regulação de síntese de ácido graxo tem expressão reduzida com relação a um micro-organismo do tipo selvagem. Em algumas concretizações, o micro-organismo geneticamente modificado adicionalmente compreende (1) um gene de piruvato

oxidase, sendo que o gene de piruvato oxidase tem expressão reduzida com relação a um micro-organismo do tipo selvagem, e (2) um gene de lactato desidrogenase, sendo que o gene de lactato desidrogenase tem expressão reduzida com relação a um micro-organismo do tipo selvagem.

[0090] Em outro aspecto, a invenção representa um micro-organismo geneticamente modificado compreendendo um gene de piruvato oxidase, sendo que o gene de piruvato oxidase tem expressão reduzida em relação a um micro-organismo do tipo selvagem.

[0091] Em outro aspecto, a invenção representa um micro-organismo geneticamente modificado compreendendo um gene de lactato desidrogenase, sendo que o gene de lactato desidrogenase tem expressão reduzida com relação a um micro-organismo do tipo selvagem.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0092] A Figura 1 é um diagrama ilustrando a rota biossintética de FAS.

[0093] A Figura 2 é um diagrama ilustrando a rota de beta-oxidação, incluindo as etapas catalisadas pelas seguintes enzimas (1) acil-CoA sintase (EC 6.2.1.-); (2) acil-CoA desidrogenase (EC 1.3.99.3); (3) enoil-CoA hidratase (EC 4.2.1.17); (4) 3-hidroxibutiril-CoA epimerase (EC 5.1.2.3); e (5) 3-cetoacil-CoA tiolase (EC 2.3.1.16). Esta reação final do ciclo de β -oxidação libera acetil-CoA e um acil-CoA ácido graxo mais curto de dois carbonos, prontos para seguir através das reações de β -oxidação novamente.

[0094] A Figura 3 é um diagrama ilustrando as rotas biossintéticas que produzem ésteres graxos, dependendo dos substratos supridos.

[0095] A Figura 4 é um diagrama ilustrando as rotas biossintéticas que produzem alcoóis graxos.

[0096] A Figura 5 é um diagrama ilustrando as rotas biossintéticas que produzem ésteres graxos.

[0097] A Figura 6 é um gráfico de ésteres produzidos por um processo de fermentação usando alimentações múltiplas de metanol e nenhum etanol exógeno.

[0098] A Figura 7 é um gráfico de ésteres como uma percentagem de produtos totais produzidos por um processo de fermentação usando múltiplas alimentações de metanol e nenhum etanol exógeno.

[0099] A Figura 8 é um gráfico de ésteres produzidos por um processo de fermentação usando uma única alimentação de metanol e nenhum etanol exógeno.

[0100] A Figura 9 é um gráfico de ésteres como uma percentagem de produtos totais produzidos por um processo de fermentação usando uma única alimentação de metanol e nenhum etanol exógeno.

[0101] A Figura 10 é um gráfico da concentração de ácidos graxos livres produzidos por um processo de fermentação sem utilização de álcool exógeno.

[0102] A Figura 11 é um gráfico da concentração de FAEE e etanol produzido por um processo de fermentação sem utilização de álcool exógeno.

[0103] A Figura 12 é um gráfico da concentração de ácidos graxos livres e FAEE como uma percentagem de produtos

totais produzidos por um processo de fermentação sem utilização de álcool exógeno.

DEFINIÇÕES

[0104] Os artigos "a" e "o" são aqui usados para se referir a um ou mais do que um (ou seja, pelo menos um) do objeto gramatical do artigo. A título de exemplo, "um elemento" significa um elemento ou mais que um elemento.

[0105] Como aqui usado, o termo "biocrude" se refere a um produto derivado de biomassa, derivados de biomassa, ou outras fontes biológicas que, como o petróleo bruto, podem ser convertidos em outros combustíveis. Por exemplo, o biocrude pode ser convertido em gasolina, diesel, combustível de aviação ou óleo de aquecimento. Além disso, o biocrude, como o petróleo bruto, pode ser convertido em outros produtos químicos utilizáveis industrialmente para uso, por exemplo, produtos farmacêuticos, cosméticos, artigos de consumo, processos industriais e semelhantes.

[0106] O biocrude pode incluir, por exemplo, hidrocarbonetos, produtos de hidrocarbonetos, ésteres de ácido graxo e/ou cetonas alifáticas. Em uma concretização preferida, o biocrude compreende hidrocarbonetos, por exemplo, alifáticos (por exemplo, alcanos, alcenos, alcinos) ou hidrocarbonetos aromáticos.

[0107] Como aqui usado, o termo "biodiesel" significa um biocombustível que pode ser um substituto do diesel, o qual é derivado de petróleo. O biodiesel pode ser usado em máquinas a diesel de combustão interna, tanto na forma pura, que se refere como biodiesel "puro" ("neat"), ou como uma mistura em qualquer concentração com diesel baseado

em petróleo. Em uma concretização, o biodiesel pode incluir ésteres ou hidrocarbonetos, tais como aldeídos, alcanos ou alcenos.

[0108] Como aqui usado, o termo "biodiesel" se refere a qualquer combustível derivado de biomassa, derivados de biomassa ou de outras fontes biológicas. Os biocombustíveis podem ser substituídos por combustíveis baseados em petróleo. Por exemplo, os biocombustíveis incluem combustíveis de transporte (por exemplo, gasolina, diesel, combustível de aviação, etc.), combustíveis de aquecimento e combustíveis de geração de energia. Os biodieseis são uma fonte renovável de energia.

[0109] Como aqui usado, o termo "biomassa" se refere a uma fonte de carbono derivada de material biológico. A biomassa pode ser convertida em um biocombustível. Uma fonte exemplificativa de biomassa é um material de planta. Por exemplo, milho, cana-de-açúcar ou grama tipo switch pode ser usado como biomassa. Outro exemplo não-limitativo de biomassa é matéria animal, por exemplo, esterco de vaca. A biomassa também inclui produtos de rejeito de indústria, da agricultura, florestal e doméstico. Exemplos de tais produtos de rejeito que podem ser usados como biomassa são rejeitos de fermentação, palha, madeira de construção, esgoto, lixo e restos de alimento. A biomassa também inclui fontes de carbono, tais como carboidratos (por exemplo, monossacarídeos, dissacarídeos ou polissacarídeos).

[0110] Como aqui usada, a frase "fonte de carbono" se refere a um substrato ou composto apropriado para ser usado como uma fonte de carbono para o crescimento de células procarióticas ou eucarióticas simples. As fontes de carbono

podem estar em várias formas, incluindo, mas não limitadas a polímeros, carboidratos, ácidos, alcoóis, aldeídos, cetonas, aminoácidos, peptídeos e gases (por exemplo, CO e CO₂). Estas incluem, por exemplo, vários monossacarídeos, tais como glucose, fructose, manose e galactose; oligossacarídeos, tais como fruto-oligossacarídeo e galacto-oligossacarídeo; polissacarídeos tais como xilose e arabinose; dissacarídeos, tais como sacarose, maltose, e turanose; material celulósico, tais como metil celulose e carboximetil celulose de sódio; ésteres de ácido graxo saturados ou insaturados, tais como succinato, lactato, e acetato; alcoóis, tais como metanol, etanol, propanol, ou misturas dos mesmos. A fonte de carbono também pode ser um produto de fotossíntese, incluindo, mas não limitada a glicose. Uma fonte de carbono preferida é biomassa. Outra fonte de carbono preferida é glicose.

[0111] Como aqui usado, o termo "aditivo de abaixamento do ponto de névoa" é um aditivo adicionado a uma composição para diminuir ou abaixar o ponto de névoa de uma solução.

[0112] Como aqui usada, a frase "ponto de névoa de um fluido" significa a temperatura na qual sólidos dissolvidos não mais ficam completamente dissolvidos. Abaixo desta temperatura, os sólidos começam a precipitar como uma segunda fase dando ao fluido uma aparência enevoadada. Na indústria de petróleo, o ponto de névoa se refere a uma temperatura abaixo da qual um material solidificado ou outro hidrocarboneto pesado cristaliza no óleo bruto, no óleo refinado ou combustível para formar uma aparência enevoadada. A presença de materiais solidificados influencia o

comportamento de escoamento do fluido, a tendência de o fluido obstruir filtros de combustível, injetores, etc., a acumulação de materiais solidificados em superfícies frias (por exemplo, *fouling* de tubulação ou de trocador de calor), e as características de emulsão do fluido com água.

[0113] Os termos “compreendendo”, “tendo”, “incluindo” e “contendo” são empregados para serem entendidos como termos abertos (por exemplo, significando “incluindo, mas não limitado a”) a menos que de outra forma seja observado.

[0114] Como aqui usado, o termo “condições suficientes para permitir a expressão” significa quaisquer condições que permitam que uma célula hospedeira ou um hospedeiro de produção produza um desejado produto, tal como, um polipeptídeo, acil-CoA, derivado de ácido graxo (por exemplo, ácidos graxos, hidrocarbonetos, alcoóis graxos, ésteres graxos, etc.) ou outro produto aqui descrito. Condições apropriadas incluem, por exemplo, condições de fermentação. As condições de fermentação podem compreender muitos parâmetros. Condições exemplificativas incluem faixas de temperatura, níveis de aeração e composição de meio. Cada uma dessas condições, individualmente e em combinação, permite que a célula hospedeira cresça.

[0115] Meios de cultura exemplificativos incluem mostos ou géis. Em geral, o meio inclui uma fonte de carbono, tal como glicose, frutose, celulose ou semelhante, que pode ser metabolizada diretamente por uma célula hospedeira. Adicionalmente, enzimas podem ser usadas no meio para facilitar a mobilização (por exemplo, a despolimerização de

amido ou celulose para açúcares fermentáveis) e subsequente metabolismo da fonte de carbono.

[0116] Para se determinar se as condições são suficientes para permitir a expressão, uma célula hospedeira pode ser cultivada, por exemplo, por cerca de 4, 8, 12, 24, 36, ou 48 horas. Durante e/ou após o cultivo, amostras podem ser obtidas e analisadas para determinar se as condições permitem a expressão. Por exemplo, as células hospedeiras na amostra ou meio no qual as células hospedeiras são crescidas podem ser testadas quanto à presença de um desejado produto. Quando realizado o teste quanto à presença de um produto, podem ser usados ensaios, tais como, mas não limitados a TLC, HPLC, GC/FID, GC/MS, LC/MS, MS.

[0117] Como aqui usada, a frase "condições que permitem a produção do produto" se refere a quaisquer condições de fermentação que permitem que o hospedeiro de produção produza um produto desejado, tal como acil-CoA ou derivados de ácido graxo (por exemplo, ácidos graxos, hidrocarbonetos, alcoóis graxos, parafinas ou ésteres graxos). As condições de fermentação usualmente compreendem muitos parâmetros. Condições exemplificativas incluem, mas não estão limitadas a faixas de temperatura, níveis de aeração e composição de meios. Cada uma dessas condições, individualmente e/ou em combinação, permite que o hospedeiro de produção cresça.

[0118] Meios exemplificativos incluem mostos e/ou géis. Em geral, um meio apropriado inclui uma fonte de carbono (por exemplo, glicose, frutose, celulose, etc.) que pode ser metabolizada diretamente pelo micro-organismo. Adicionalmente, enzimas podem ser usadas no meio para

facilitar a mobilização (por exemplo, a despolimerização de amido ou celulose para açúcares fermentáveis) e subsequente metabolismo da fonte de carbono.

[0119] Para determinar se as condições de fermentação permitem a produção de produto, o hospedeiro de produção pode ser cultivado por cerca de 4, 8, 12, 24, 36 ou 48 horas. Durante o cultivo ou após o cultivo, amostras podem ser obtidas e analisadas para determinar se as condições de fermentação permitiram a produção de produto. Por exemplo, os hospedeiros de produção na amostra ou no meio no qual os hospedeiros de produção são crescidos podem ser testados quanto à presença do produto desejado. Ensaios exemplificativos, tais como TLC, HPLC, GC/FID, GC/MS, LC/MS, MS, assim como aqueles aqui providos, podem ser usados para identificar e quantificar a presença de um produto.

[0120] Como aqui usado, o termo "elemento de controle" significa um elemento de controle de transcrição. Os elementos de controle incluem promotores e *enhancers*. O termo "elemento de promotor", "promotor", ou "sequência de promotor" se refere a uma sequência de DNA que funciona como um comutador que ativa a expressão de um gene. Se o gene está ativado, ele é dito ser transcrito ou participando da transcrição. A transcrição envolve a síntese de mRNA a partir do gene. Um promotor, portanto, serve como um elemento de regulação de transcrição e também provê um sítio para a iniciação de transcrição do gene para mRNA. Os elementos de controle interagem especificamente com as proteínas celulares envolvidas na transcrição (Maniatis *et al.*, *Science* 236:1237, 1987).

[0121] Como aqui usado, o termo "deleção" ou "desligamento" significa modificar ou inativar uma sequência de polinucleotídeo que codifica uma proteína alvo de maneira a reduzir ou eliminar a função da proteína alvo. Uma deleção de polinucleotídeo pode ser realizada por métodos bem conhecidos no estado da técnica (ver, por exemplo, Datsenko *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 97:6640-45, 2000 ou Pedidos de Patente Internacional Nos. PCT/US2007/011923 e PCT/US2008/058788).

[0122] Como aqui usado, o termo "endógeno" significa um polinucleotídeo que está na célula e que não foi introduzido na célula usando técnicas de engenharia genética recombinante. Por exemplo, um gene que estava presente na célula quando a célula foi originalmente isolada a partir da natureza. Um polinucleotídeo é ainda considerado endógeno se as sequências de controle, tal como as sequências de promotor ou de *enhancer* que ativam a transcrição ou a tradução, haviam sido alteradas através das técnicas recombinantes.

[0123] Como aqui usado, o termo "éster sintase" significa um peptídeo capaz de produzir ésteres graxos. Mais especificamente, uma éster sintase é um peptídeo que converte um tioéster em um ácido graxo. Em uma concretização preferida, a éster sintase converte um tioéster (por exemplo, acil-CoA) em um éster graxo.

[0124] Em uma concretização alternativa, uma éster sintase usa um tioéster e um álcool como substratos para produzir um éster graxo. Éster sintases são capazes de usar tioésteres de cadeia curta e longa como substratos. Adicionalmente, éster sintases são capazes de usar alcoóis de cadeia curta e longa como substratos.

[0125] Exemplos não-limitativos de éster sintases são sintases parafínicas, sintases éster-parafínicas, acil-CoA:álcool transacilases, aciltransferases e acil-coenzima A graxo:álcool graxo aciltransferases. Éster sintases exemplificativas são classificadas em classificação de enzima número EC 2.3.1.75. Inúmeras dessas enzimas, assim como outras enzimas utilizáveis para produzir os produtos aqui descritos, foram reveladas, por exemplo, nos Pedidos de Patente Internacional Nos. PCT/US2007/011923 e PCT/US2008/058788 (por exemplo, Figura 1), os quais são aqui incorporados a título de referência.

[0126] Como aqui usado, o termo "exógeno" significa um polinucleotídeo que não se origina de uma célula particular como encontrada na natureza. Por exemplo, o "polinucleotídeo exógeno" pode se referir a um polinucleotídeo que foi inserido dentro da sequência genômica de polinucleotídeo de um micro-organismo ou a um polinucleotídeo extra cromossômico que foi introduzido no microrganismo. Portanto, um polinucleotídeo de ocorrência não-natural é considerado ser exógeno com relação a uma célula uma vez que tenha sido introduzido na célula. Um polinucleotídeo que é de ocorrência natural pode também ser exógeno com relação a uma célula particular. Por exemplo, um polinucleotídeo completo isolado a partir de uma primeira célula pode ser um polinucleotídeo exógeno com relação a uma segunda célula se aquele polinucleotídeo oriundo da primeira célula for introduzido na segunda célula.

[0127] Como aqui usado, o termo "ácido graxo" significa um ácido carboxílico tendo a fórmula RCOOH . R representa um grupo alifático, preferencialmente um grupo

alquila. R pode compreender entre cerca de 4 até cerca de 22 átomos de carbono. Os ácidos graxos podem ser saturados, monoinsaturados ou poliinsaturados. Em uma concretização preferida, o ácido graxo é produzido a partir de uma rota biossintética de ácido graxo.

[0128] Como aqui usado, o termo "rota biossintética de ácido graxo" significa uma rota biossintética que produz ácidos graxos. A rota biossintética de ácido graxo inclui enzimas de ácido graxo que podem ser modificadas, como aqui descrito, para produzir ácidos graxos, e em algumas concretizações podem ser expressados com enzimas adicionais para produzir ácidos graxos tendo características desejadas de cadeia de carbono.

[0129] Como aqui usado, o termo "enzima de degradação de ácido graxo" significa uma enzima envolvida na quebra ou conversão de um ácido graxo ou de um derivado de ácido graxo em outro produto. Um exemplo não-limitativo de uma enzima de degradação de ácido graxo é uma acil-CoA sintase. Inúmeras dessas enzimas, assim como outras enzimas utilizáveis na produção de produtos aqui descritos, foram descritos, por exemplo, nos Pedidos de Patente Internacional Nos. PCT/US2007/011923 e PCT/US2008/058788 (por exemplo, Figura 1), os quais são aqui incorporados a título de referência. Exemplos adicionais de enzimas de degradação de ácido graxo são aqui descritos.

[0130] Como aqui usado, o termo "derivado de ácido graxo" significa produtos produzidos em parte a partir da rota biossintética de ácido graxo do hospedeiro de produção. O termo "derivado de ácido graxo" também inclui produtos produzidos em parte a partir de acil-ACP ou de derivados de

acil-ACP. A rota biossintética de ácido graxo inclui uma enzima ácido graxo sintase que pode ser modificada como aqui descrito para produzir derivados de ácido graxo, e em alguns exemplos, pode ser expressada com enzimas adicionais para produzir derivados de ácido graxo tendo características desejadas de cadeia de carbono. Derivados de ácido graxo exemplificativos incluem, por exemplo, ácidos graxos, acil-CoAs, aldeídos graxos, alcoóis de cadeia curta e longa, hidrocarbonetos, alcoóis graxos, cetonas e ésteres (por exemplo, parafinas, ésteres de ácido graxo ou ésteres graxos).

[0131] Como aqui usado, o termo "enzimas de derivado de ácido graxo" significa todas as enzimas que podem ser expressadas ou superexpressadas na produção de derivados de ácido graxo. Essas enzimas são coletivamente aqui referidas como enzimas de derivado de ácido graxo. Essas enzimas podem ser parte da rota biossintética de ácido graxo. Exemplos não limitativos de enzimas de derivado de ácido graxo incluem ácido graxo sintases, tioésterases, acil-CoA sintases, acil-CoA redutases, álcool desidrogenases, álcool aciltransferases, ácido carboxílico redutases, acil-CoA redutase formadora de álcool graxo, éster sintases, polipeptídeos biossintéticos de aldeído e polipeptídeos biossintéticos de alcano. As enzimas de derivado de ácido graxo convertem um substrato em um derivado de ácido graxo. Em alguns exemplos, o substrato pode ser um derivado de ácido graxo, o qual a enzima de derivado de ácido graxo converte em um derivado de ácido graxo. Inúmeras dessas enzimas, assim como outras enzimas utilizáveis na produção de produtos aqui descritos, foram descritos, por exemplo, nos Pedidos de

Patente Internacional Nos. PCT/US2007/011923 e PCT/US2008/058788 (por exemplo, Figura 1), os quais são aqui incorporados a título de referência.

[0132] Como aqui usado, o termo "enzima de ácido graxo" significa qualquer enzima envolvida na biossíntese de ácido graxo. As enzimas de ácido graxo podem ser expressadas ou superexpressadas nas células hospedeiras para produzir ácidos graxos. Exemplos não-limitativos de enzimas de ácido graxo incluem ácido graxo sintases e tioésterases. Inúmeras dessas enzimas, assim como outras enzimas utilizáveis para produzir os produtos aqui descritos, foram descritas, por exemplo, nos Pedidos de Patente Internacional Nos. PCT/US2007/011923 e PCT/US2008/058788 (por exemplo, Figura 1), os quais são aqui incorporados a título de referência.

[0133] Como aqui usado, o termo "éster graxo" significa um éster. Em uma concretização preferida, um éster graxo é qualquer éster produzido a partir de um ácido graxo para produzir, por exemplo, um éster de ácido graxo. Em uma concretização, um éster graxo contém um lado A (ou seja, a cadeia de carbono ligada ao oxigênio do carboxilato) e um lado B (ou seja, a cadeia de carbono compreendendo o carboxilado parental). Em uma concretização preferida, quando o éster graxo é derivado a partir da rota biossintética de ácido graxo, o lado A é contribuído por um álcool, e o lado B é contribuído por um ácido graxo. Qualquer álcool pode ser usado para formar o lado A dos ésteres graxos. Por exemplo, o álcool pode ser derivado a partir da rota biossintética de ácido graxo. Alternativamente, o álcool pode ser produzido através de rotas biossintéticas de ácido não graxo. Além disso, o álcool pode ser provido de

modo exógeno. Por exemplo, o álcool pode ser alimentado no mosto de fermentação em circunstâncias nas quais o éster graxo é produzido por um organismo que também pode produzir o ácido graxo. Alternativamente, um ácido carboxílico, tal como um ácido graxo ou ácido acético, pode ser alimentado de modo exógeno em circunstâncias nas quais o éster graxo é produzido por um organismo que também pode produzir álcool.

[0134] As cadeias de carbono compreendendo o lado A ou o lado B podem ser de qualquer comprimento. Em uma concretização, o lado A do éster tem um comprimento de pelo menos cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 16, ou 18 carbonos. O lado B do éster tem um comprimento de pelo menos cerca de 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, ou 26 carbonos. O lado A e/ou o lado B podem ser de cadeia reta ou ramificada. As cadeias ramificadas podem ter um ou mais pontos de ramificação. Adicionalmente, as cadeias ramificadas podem incluir ramificações cíclicas. Além disso, o lado A e/ou lado B pode ser saturado ou insaturado. Se for insaturado, o lado A e/ou lado B pode ter um ou mais pontos de insaturação.

[0135] Em uma concretização, o éster graxo é produzido biossinteticamente. Nesta concretização, primeiramente o ácido graxo é "ativado". Exemplos não-limitativos de ácidos graxos "ativados" são acil-CoA, acil-ACP e acil fosfato. Acil-CoA pode ser um produto direto de biossíntese ou de degradação de ácido graxo. Adicionalmente, acil-CoA pode ser sintetizada a partir de um ácido graxo livre, uma CoA, ou uma adenosina nucleotídeo trifosfato (ATP). Um exemplo de uma enzima que produz acil-CoA é acil-CoA sintase.

[0136] Após o ácido graxo ter sido ativado, ele pode ser prontamente transferido para um receptor nucleofílico. Nucleófilos exemplificativos são alcoóis, tióis ou fosfatos.

[0137] Em uma concretização, o éster graxo é uma parafina. A parafina pode ser derivada de um álcool de cadeia longa e de um ácido graxo de cadeia longa. Em outra concretização, o éster graxo pode ser derivado a partir de um acil-tioéster e um álcool. Em outra concretização, o éster graxo é um tioéster de ácido graxo, por exemplo, acil Coenzima A (CoA) graxo. Em outras concretizações, o éster graxo é um acil pantotenato graxo, uma proteína portadora de acila (ACP), ou um fosfato éster graxo. Os ésteres graxos têm muitos usos. Por exemplo, os ésteres graxos podem ser usados como biocombustíveis, tensoativos ou formulados em aditivos que fornecem lubrificação e outros benefícios a combustíveis e produtos químicos industriais.

[0138] Como aqui usado, o termo "fração de carbono moderno" ou " f_M " possui o mesmo significado como definido pelos Materiais de Referência Padrão (SRMs) 4990B e 4990C do National Institute of Standards and Technology (NIST), conhecidos como padrões de ácidos oxálicos HOxI e HOxII, respectivamente. A definição fundamental se refere a 0,95 vezes a razão do isótopo $^{14}\text{C} / ^{12}\text{C}$ HOxI (referente ao AD 1950). Isto é aproximadamente equivalente à madeira de pré-Revolução Industrial corrigida com relação ao declínio. Para a atual biosfera viva (por exemplo, material de planta), F_M é aproximadamente 1,1.

[0139] Os cálculos de "homologia" entre duas sequências podem ser realizados como se segue. As sequências são alinhadas para propósitos de comparação ótima (por

exemplo, *gaps* podem ser introduzidos em uma ou ambas de uma primeira e de uma segunda sequência de aminoácidos ou de ácido nucléico para alinhamento ótimo e sequências não-homólogas podem ser desprezadas para finalidade de comparação). Em uma concretização preferida, o comprimento da sequência de referência que é alinhada para propósitos de comparação tem pelo menos cerca de 30%, preferencialmente pelo menos cerca de 40%, mais preferidamente pelo menos cerca de 50%, mesmo mais preferencialmente pelo menos cerca de 60%, e mesmo mais preferivelmente pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 90% ou cerca de 100% do comprimento da sequência de referência. Os resíduos de aminoácido ou nucleotídeos nas correspondentes posições de aminoácido ou posições de nucleotídeo são então comparados. Quando uma posição na primeira sequência é ocupada pelo mesmo resíduo aminoácido ou nucleotídeo como a correspondente posição na segunda sequência, então as moléculas são idênticas naquela posição (como aqui usada, a "identidade" de aminoácido ou de ácido nucléico é equivalente à "homologia" de aminoácido ou de ácido nucléico). A identidade percentual entre as duas sequências é uma função do número de posições idênticas compartilhadas pelas sequências, levando em consideração o número de *gaps* e o comprimento de cada *gap*, o qual precisa ser introduzido para alinhamento ótimo das duas sequências.

[0140] A comparação de sequências e a determinação da homologia percentual entre as duas sequências podem ser realizadas usando um algoritmo matemático. Em uma concretização preferida, a homologia percentual entre duas sequências de aminoácidos é determinada usando o Needleman

e Wunsch (1970), *J. Mol. Biol.* 48:444 453, algoritmo que tem sido incorporado no programa GAP no pacote de software GCG, usando ou uma matriz Blossum 62 ou uma matriz PAM250, e um peso de gap de 16, 14, 12, 10, 8, 6, ou 4 e um peso de comprimento de 1, 2, 3, 4, 5, ou 6. Ainda em outra concretização preferida, a homologia percentual entre duas sequências de nucleotídeos é determinada usando o programa GAP no pacote de software GCG, usando uma matriz NWSgapdna. CMP e um peso de gap de cerca de 40, 50, 60, 70, ou 80 e um peso de comprimento de cerca de 1, 2, 3, 4, 5, ou 6. Um conjunto particularmente preferido de parâmetros (e aquele que deve ser usado se o praticante estiver incerto acerca de quais parâmetros devem ser aplicados para determinar se uma molécula está dentro do limite de homologia das reivindicações) é uma matriz de contagem de escore Blossum 62 com uma penalidade de gap de 12, uma penalidade de extensão de gap de 4, e uma penalidade de gap de mudança de quadro (*frameshift*) de 5.

[0141] Outros métodos de alinhamento de sequências para comparação são bem conhecidos no estado da técnica. Vários programas e algoritmos de alinhamento estão descritos, por exemplo, em Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482, 1981; Pearson & Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444, 1988; Higgins & Sharp, *Gene* 73:237 244, 1988; Higgins & Sharp, *CABIOS* 5:151-153, 1989; Corpet *et al.*, *Nucleic Acids Research* 16:10881-10890, 1988; Huang *et al.*, *CABIOS* 8:155-165, 1992; e Pearson *et al.*, *Methods in Molecular Biology* 24:307-331, 1994. e Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215:403-410, 1990.

[0142] Como aqui usado, o termo uma "célula hospedeira" é uma célula usada para produzir um produto aqui descrito (por exemplo, um aldeído ou alceno). Uma célula hospedeira pode ser modificada para expressar ou superexpressar genes selecionados ou para ter a expressão atenuada de genes selecionados. Exemplos não-limitativos de células hospedeiras incluem células de planta, animal, bactéria, cianobactéria, levedura ou fungos filamentosos.

[0143] Como aqui usado, o termo "micro-organismo" significa espécie microbiana procariótica e eucariótica oriunda dos domínios Archaea, Bacteria e Eucarya, a última incluindo levedura e fungos filamentosos, protozoários, algas, ou Protista superior. O termo "célula microbiana", como aqui usado, significa uma célula oriunda de um micro-organismo.

[0144] Como aqui usado, o termo "ácido nucléico" se refere a um polinucleotídeo, tal como ácido desoxirribonucleico (DNA), e, quando apropriado, ácido ribonucleico (RNA). O termo também inclui análogos de RNA ou de DNA produzidos a partir de análogos de nucleotídeo, e, quando aplicável à concretização que está sendo descrita, polinucleotídeos de fita única (senso ou antisenso) e de fita dupla, ESTs, cromossomos, cDNAs, mRNAs e rRNAs. O termo "ácido nucléico" pode ser usado de modo intercambiável com "polinucleotídeo", "DNA", "molécula de ácido nucléico", "sequência de nucleotídeos" e/ou "gene" a menos que de outra forma esteja indicado ou que claramente seja contradito pelo contexto.

[0145] Como aqui usado, o termo "operacionalmente ligado" significa que uma selecionada sequência de

nucleotídeos (por exemplo, codificante de um polipeptídeo aqui descrito) está em relação de proximidade com um promotor para permitir que o promotor regule a expressão da sequência de nucleotídeos selecionada. Adicionalmente, o promotor está localizado acima da sequência de nucleotídeos selecionada em termos da direção de transcrição e tradução. O termo "operacionalmente ligado" é para significar que uma sequência de nucleotídeos e sequência(s) de regulação estão conectadas de tal maneira a permitir a expressão do gene quando as moléculas apropriadas (por exemplo, proteínas do ativador de transcrição) estão ligadas à(s) sequência(s) de regulação.

[0146] O termo "ou" é aqui usado para significar, e é usado de modo intercambiável com o termo "e/ou", a menos que o contexto claramente indique de modo diferente.

[0147] Como aqui usado, o termo "superexpressar" significa expressar ou fazer com que seja expressado ou produzido um ácido nucléico, um polipeptídeo, ou hidrocarboneto em uma célula com uma concentração maior do que a que é normalmente expressada em uma correspondente célula do tipo selvagem. Por exemplo, um polipeptídeo pode ser "superexpressado" em uma célula hospedeira recombinante quando o polipeptídeo está presente em uma concentração maior na célula hospedeira recombinante comparada à sua concentração em uma célula hospedeira não-recombinante da mesma espécie.

[0148] Como aqui usado, o termo "coeficiente de partição" ou "P", é definido como a concentração de equilíbrio de um composto em uma fase orgânica dividido pela concentração no equilíbrio em uma fase aquosa (por exemplo,

mosto de fermentação). Em uma concretização de um sistema bifásico aqui descrito, a fase orgânica é formada pelo aldeído ou alceno durante o processo de produção. Entretanto, em alguns exemplos, pode ser provida uma fase orgânica, tal como pelo provimento de uma camada de octano, para facilitar a separação do produto. Quando se descreve um sistema de duas fases, as características de partição de um composto podem ser descritas como logP. Por exemplo, um composto com um logP de 1 teria a partição de 10:1 para a fase orgânica. Um composto com um logP de -1 teria a partição de 1:10 para a fase orgânica. Pela escolha de um mosto de fermentação e fase orgânica apropriados, um derivado orgânico de ácido graxo ou produto com um valor alto de logP pode se separar para a fase orgânica mesmo em muito baixas concentrações no reator de fermentação.

[0149] Como aqui usado, o termo "polipeptídeo" pode ser usado de modo intercambiável com "proteína", "peptídeo", e/ou "enzima" a menos que de outra forma seja aqui indicado ou que claramente seja contradito pelo contexto.

[0150] Como aqui usado, o termo "hospedeiro de produção" significa uma célula usada para produzir os produtos aqui revelados. O hospedeiro de produção é modificado para expressar, superexpressar, atenuar ou deletar a expressão de polinucleotídeos selecionados. Exemplos não-limitativos de hospedeiros de produção incluem células de planta, alga, animal, ser humano, bactéria, levedura e fungos filamentosos.

[0151] Como aqui usado, o termo "purificar", "purificado" ou "purificação" significa a remoção ou isolamento de uma molécula a partir do seu ambiente por, por

exemplo, isolamento ou separação. Moléculas “substancialmente purificadas” são pelo menos cerca de 60% isentas, preferencialmente pelo menos cerca de 75% isentas, e mais preferencialmente pelo menos cerca de 90% isentas de outros componentes com os quais elas estejam associadas. Como aqui usados, esses termos também se referem à remoção de contaminantes de uma amostra. Por exemplo, a remoção de contaminantes pode resultar em um aumento na percentagem de derivado de ácido graxo ou produto na amostra. Por exemplo, quando derivados de ácido graxo ou produtos são produzidos em uma célula hospedeira, os derivados de ácido graxo ou produtos podem ser purificados pela remoção de proteínas de célula do hospedeiro. Após a purificação, a percentagem de derivados de ácido graxo ou produtos na amostra fica aumentada.

[0152] Os termos “purificar”, “purificado” e “purificação” não requerem pureza absoluta. Eles são termos relativos. Assim, por exemplo, quando derivados de ácido graxo ou produtos são produzidos em células hospedeiras, um derivado de ácido graxo ou produto purificado é aquele que está substancialmente separado de outros componentes celulares (por exemplo, ácidos nucleicos, polipeptídeos, lipídios, carboidratos, ou outros derivados de ácido graxo ou produtos). Em outro exemplo, um derivado de ácido graxo purificado ou preparação de produto purificado é aquele no qual o derivado de ácido graxo ou produto fica substancialmente isento de contaminantes, tais como aqueles que podem estar presentes em seguida à fermentação. Em algumas concretizações, um derivado de ácido graxo ou produto é purificado quando pelo menos cerca de 50% em peso de uma

amostra é composto do derivado de ácido graxo ou produto. Em outras concretizações, um derivado de ácido graxo ou produto é purificado quando pelo menos cerca de 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 98%, ou 99% ou mais em peso de uma amostra é composto do derivado de ácido graxo ou produto.

[0153] Como aqui usado, o termo "polipeptídeo recombinante" se refere a um polipeptídeo que é produzido por meio de técnicas de DNA recombinante, sendo que, em geral, o DNA codificante do polipeptídeo ou RNA expressado é inserido em um vetor de expressão apropriado e este, por sua vez, é usado para transformar uma célula hospedeira para produzir o polipeptídeo ou RNA.

[0154] Como aqui usado, o termo "substancialmente idêntico" (ou "substancialmente homólogo") é usado para se referir a uma primeira sequência de aminoácidos ou de nucleotídeos que contém um número suficiente de resíduos de aminoácido (por exemplo, substituições conservadas de aminoácido) ou de nucleotídeos idêntico ou equivalente (por exemplo, com uma cadeia lateral similar) a uma segunda sequência de aminoácidos ou de nucleotídeos de modo que a primeira e segunda sequências de aminoácidos ou nucleotídeos tenham atividades similares.

[0155] Como aqui usado, o termo "tensoativos" significa uma substância capaz de reduzir a tensão superficial de um líquido no qual ele está dissolvido. Um tensoativo é tipicamente composto de uma cabeça solúvel em água e uma cadeia ou cauda de hidrocarboneto. A cabeça solúvel em água é hidrofílica e pode ser iônica ou não-iônica. A cadeia de hidrocarboneto é hidrofóbica. Os tensoativos são usados em uma variedade de produtos. Por

exemplo, tensoativos são usados nas composições ou produção de detergentes, alvejantes, têxteis, couro, papel, cosméticos, produtos farmacêuticos, alimentos processados e produtos agrícolas. Adicionalmente, tensoativos podem ser usados na extração ou isolamento de óleos brutos.

[0156] Há quatro categorias majoritárias de tensoativos os quais são caracterizados pelos seus usos. Tensoativos aniônicos têm atividade semelhante a detergente e são geralmente usados em aplicações de limpeza. Os tensoativos catiônicos contêm hidrocarbonetos de cadeia longa e são frequentemente usados para tratar proteínas e polímeros sintéticos ou são componentes de amaciantes de tecido e condicionadores de cabelo. Os tensoativos anfóteros também contêm hidrocarbonetos de cadeia longa, mas são tipicamente usados em xampus. Os tensoativos não-iônicos são geralmente usados em produtos de limpeza.

[0157] Como aqui usado, o termo "sintase" significa uma enzima que catalisa um processo de síntese. Como aqui usado, o termo sintase inclui sintases, sintases e ligases.

[0158] Como aqui usado, o termo "transfecção" significa a introdução de um ácido nucléico (por exemplo, via um vetor de expressão) em uma célula receptora por transferência de gene mediada por ácido nucléico.

[0159] Como aqui usado, o termo "transformação" se refere a um processo no qual um genótipo de célula é mudado como resultado da captação celular do ácido nucléico exógeno. Isto pode resultar na célula transformada que expressa uma forma recombinante de um RNA ou polipeptídeo. No caso de expressão antisenso a partir do gene transferido, a expressão de uma forma de ocorrência natural do polipeptídeo é rompida.

[0160] Como aqui usado, o termo "proteína de transporte" significa um polipeptídeo que facilita o movimento de um ou mais compostos para dentro e/ou para fora de uma organela celular e/ou de uma célula. Inúmeras dessas proteínas, assim como outras proteínas utilizáveis na produção dos produtos aqui descritos, foram reveladas, por exemplo, nos Pedidos de Patente Internacional Nos. PCT/US2007/011923 e PCT/US2008/058788 (por exemplo, Figura 1), os quais são aqui incorporados a título de referência.

[0161] Como aqui usado, o termo "vetor" se refere a uma molécula de ácido nucléico capaz de transportar outro ácido nucléico ao qual ela havia sido ligada. Um tipo de vetor utilizável é um epissomo (ou seja, um ácido nucléico capaz de replicação extra-cromossômica). Vetores utilizáveis são aqueles capazes de replicação autônoma e/ou expressão dos ácidos nucléicos aos quais eles estão ligados. Os vetores capazes de dirigir a expressão de genes aos quais eles estão operacionalmente ligados são aqui referidos como "vetores de expressão". Em geral, os vetores de expressão de utilidade em técnicas de DNA recombinante estão frequentemente na forma de "plasmídeos", os quais se referem, em geral, a loops circulares de DNA de dupla fita que, na sua forma de vetor, não estão ligados ao cromossomo. Na presente descrição, "plasmídeo" e "vetor" são usados de modo intercambiável, na medida em que o plasmídeo é a forma de vetor mais comumente usada. Entretanto, também estão incluídas outras formas de vetores de expressão que servem a funções equivalentes e que se tornarem conhecidos na técnica subsequentemente a esta descrição.

[0162] Como aqui usado, o termo "parafina" ("wax") significa uma composição compreendida de ésteres graxos. Em uma concretização preferida, o éster graxo compreendido na parafina é compreendido de cadeias de carbono desde médias a longas. Adicionalmente a ésteres graxos, uma parafina pode compreender outros componentes (por exemplo, hidrocarbonetos, ésteres de ésterol, aldeídos alifáticos, alcoóis, cetonas, beta-dicetonas, trigliceróis, etc).

[0163] Ao longo da descrição, pode ser feita referência usando um nome de gene ou nome de polipeptídeo abreviado, mas deve ser entendido que tal nome de gene ou de polipeptídeo abreviado representa o gênero de genes ou de polipeptídeos. Tais nomes de gene incluem todos os genes codificantes do mesmo polipeptídeo e de polipeptídeos homólogos tendo a mesma função fisiológica. Os nomes de polipeptídeo incluem todos os polipeptídeos que têm a mesma atividade (por exemplo, que catalisam a mesma reação química fundamental).

[0164] Os números de acesso aqui referidos são derivados da base de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information) mantido pelo National Institute of Health, E.U.A. A menos que seja de outra forma indicado, os números de acesso são aqueles providos na base de dados de outubro de 2009.

[0165] Os números EC são estabelecidos pelo Comitê Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB) (disponível em <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>). Os números EC aqui referidos são derivados da base de dados KEGG Ligand, mantida pela Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomics,

patrocinada, em parte, pela Universidade de Tóquio. A menos que de outra forma seja indicado, os números EC são aqueles providos na base de dados de abril de 2009.

[0166] A menos que de outra forma seja definido, todos os termos técnicos e científicos aqui usados têm o mesmo significado como comumente entendido por uma pessoa versada na técnica à qual a invenção pertence.

[0167] Apesar de métodos e materiais similares ou equivalentes àqueles aqui descritos poderem ser usados na prática ou teste da presente invenção, métodos e materiais apropriados são aqui descritos. Todos os métodos aqui descritos podem ser praticados em qualquer ordem apropriada a menos que de outra forma seja aqui indicado ou que claramente seja contradito pelo contexto.

[0168] A menos que de outra forma seja estabelecido, as quantidades listadas em percentagem (%) são percentagem em peso, com base no peso total da composição.

[0169] Todas as publicações, pedidos de patente, patentes, e outras referências aqui mencionadas são incorporadas a título de referência na sua integralidade. Em caso de conflito, a presente descrição, incluindo definições, será o controle. Adicionalmente, os materiais, métodos e exemplos são somente ilustrativos e não têm a intenção de ser limitativos.

[0170] A citação de faixas de valores feitas aqui meramente tem a intenção de servir como um método taquigráfico de se referir individualmente a cada valor separado que esteja dentro da faixa, a menos que de outra forma seja aqui indicado, e cada valor separado é incorporado à descrição como se ele fosse individualmente aqui citado.

[0171] O uso de qualquer um e de todos os exemplos, ou a linguagem exemplificativa (por exemplo, "tal como") aqui provida, tem meramente a intenção de melhor ilustrar a invenção e não significa uma limitação do escopo da invenção a menos que de outra forma seja reivindicado. Nenhuma linguagem na descrição deve ser interpretada como indicativa de qualquer elemento não-reivindicado como essencial na prática da invenção.

[0172] Outros aspectos e vantagens da invenção ficarão evidentes a partir da descrição detalhada a seguir e a partir das reivindicações.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0173] Esta descrição se refere à produção de ésteres graxos, tais como ésteres etílicos de ácido graxo ("FAEE"), a partir de células recombinantes sem o provimento de álcool exógeno, tal como etanol ou metanol exógeno, às células. A produção de ésteres de ácido graxo sem o provimento de álcool exógeno simplifica o processo de fermentação, reduz os custos e a manipulação de matérias-primas adicionais, e evita a necessidade de armazenar alcoóis inflamáveis. Isto provê uma vantagem econômica.

[0174] Muitas células e micro-organismos podem usar ácidos graxos como fontes de energia e, portanto, contêm rotas de β -oxidação que metabolizam ácidos graxos para produzir energia. Foi descoberto que a superexpressão de um peptídeo tendo atividade de acil-CoA sintase (a primeira atividade enzimática encontrada na rota de β -oxidação), e/ou atenuação de outros genes na rota de beta oxidação, pode aumentar a quantidade de acil-CoA produzida, enquanto se

mantém a viabilidade da célula ou micro-organismo. Semelhantemente, a superexpressão de um peptídeo tendo atividade de acil-CoA sintase em combinação com a superexpressão de peptídeos que formam derivados de ácido graxo pode melhorar a produção de derivado de ácido graxo. Os métodos para melhorar a produção de derivado de ácido graxo em cultura de células são revelados no WO2008/119082.

[0175] Surpreendentemente, foi descoberto que células recombinantes podem ser modificadas para produzir ésteres de ácido graxo, tal como FAEE, sem a necessidade de prover álcool exógeno às células. Em alguns métodos, nem etanol exógeno, nem metanol exógeno é provido às células. Em outros métodos, nenhum álcool exógeno é provido às células. Em alguns métodos, a célula recombinante é uma célula recombinante de *E. coli*.

[0176] Sem ficar limitado a qualquer teoria particular, acredita-se que os métodos para produzir FAEE aqui revelados aumentam a produção de etanol pelas células recombinantes. Adicionalmente, as células recombinantes são modificadas para produzir ácidos graxos e para expressar um gene codificante de uma enzima éster sintase. Sem ficar limitado a uma teoria particular, acredita-se que os ácidos graxos e o etanol endógeno produzidos pelas células recombinantes atuam como matérias-primas para a enzima parafina sintase para formar ésteres de ácido graxo, tal como FAEE.

[0177] Os ácidos graxos produzidos pelos métodos aqui descritos não estão limitados a ésteres de qualquer comprimento ou outras características particulares. Por exemplo, um micro-organismo pode ser geneticamente

modificado para produzir quaisquer ésteres graxos descritos em Knothe, Fuel Processing Technology 86:1059-1070, 2005, usando os ensinamentos aqui providos. Tais ésteres graxos podem ser caracterizados por Índice de Cetano (*Cetane Number*, CN), viscosidade, ponto de fusão e calor de combustão.

I. Produção de Derivados de Ácido Graxo e Modificações para Aumentar a Produção

[0178] O hospedeiro de produção para produzir acil-CoA e/ou derivados de ácido graxo podem ser modificados de modo recombinante para incluir sequências de ácido nucléico que superexpressam peptídeos. Por exemplo, o hospedeiro de produção pode ser modificado para aumentar a produção de acil-CoA e reduzir o catabolismo de derivados de ácido graxo e intermediários na rota biossintética de ácido graxo, tal como acil-CoA, ou para reduzir a retro-inibição em pontos específicos na rota biossintética de ácido graxo. Adicionalmente, para modificar os genes aqui descritos, recursos celulares adicionais podem ser desviados para super-produzir ácidos graxos, por exemplo, as rotas de lactato, succinato e/ou acetato podem ser atenuadas, e a acetil-CoA carboxilase (*acc*) pode ser superexpressada. As modificações aqui descritas para o hospedeiro de produção podem ser através de alterações genômicas, adição de sistemas de expressão recombinante ou combinações dos mesmos.

[0179] As rotas biossintéticas de ácido graxo envolvidas são ilustradas desde a Figura 1 até a Figura 5. As subseções A-G abaixo descrevem as etapas nessas rotas. Diferentes etapas na rota são catalisadas por diferentes enzimas. Cada etapa é um lugar potencial para a

superexpressão do gene para produzir mais enzima e, assim, dirigir a produção de mais ácidos graxos e derivados de ácido graxo. Os genes codificantes de enzimas requeridos para a rota também podem ser adicionados de modo recombinante ao hospedeiro de produção que tem falta de tais enzimas. Finalmente, as etapas, que podem competir com a rota conduzindo à produção de ácidos graxos e derivados de ácidos graxos, podem ser atenuadas ou bloqueadas de modo a aumentar a produção dos produtos desejados. Os métodos para produzir derivados de ácido graxo estão descritos no WO2008/119082, o qual é aqui incorporado a título de referência na sua integralidade.

A. Acetil-CoA-Malonil-CoA para Acil-ACP

[0180] A ácido graxo sintase (FAS) é um grupo de peptídeos que catalisa a iniciação e alongamento de cadeias acila (Marrakchi *et al.*, *Biochemical Society*, 30:1050-1055, 2002). A proteína portadora de acila (ACP) juntamente com as enzimas na rota de FAS controlam o comprimento, grau de saturação e ramificação dos ácidos graxos produzidos. As etapas nesta rota são catalisadas por enzimas da biossíntese de famílias dos genes de ácido graxo (*fab*) e de acetil-CoA carboxilase (*acc*). Dependendo do produto desejado, um ou mais desses genes pode ser atenuado ou superexpressado.

1. Rota Biossintética de Ácido Graxo: acetil-CoA ou malonil-CoA para acil-ACP

[0181] A rota biossintética de ácido graxo no hospedeiro de produção usa os precursores acetil-CoA e malonil-CoA (Figura 1). As etapas nesta rota são catalisadas

por enzimas das famílias de genes de biossíntese de ácido graxo (*fab*) e acetil-CoA carboxilase (*acc*). Esta rota está descrita em Heath *et al.*, *Prog. Lipid Res.* 40(6):467-97 (2001), a qual é aqui incorporada na sua integralidade.

[0182] A acetil-CoA é carboxilada pela acetil-CoA carboxilase (Acc, uma enzima multisubunidade codificada por quatro genes separados, *accABCD*), para formar malonil-CoA. O grupo malonato é transferido para ACP por meio da malonil-CoA:ACP transacilase (FabD) para formar malonil-ACP. Uma reação de condensação então ocorre, onde malonil-ACP funde-se com acetil-CoA, resultando em β -cetoacil-ACP. A β -cetoacil-ACP sintase III (FabH) inicia o ciclo FAS, enquanto β -cetoacil-ACP sintase I (FabB) e β -cetoacil-ACP sintase II (FabF) são envolvidos em ciclos subsequentes.

[0183] Em seguida, um ciclo de etapas é repetido até que um ácido graxo de comprimento apropriado seja produzido. Primeiramente, a β -cetoacil-ACP é reduzida por NADPH para formar β -hidroxiacil-ACP. Esta etapa é catalisada por β -cetoacil-ACP redutase (FabG). β -hidroxiacil-ACP é então desidratada para transformar *trans*-2-enoil-ACP. β -hidroxiacil-ACP desidratase/isomerase (FabA) ou β -hidroxiacil-ACP desidratase (FabZ) catalisa esta etapa. *trans*-2-enoil-ACP redutase I, II, ou III (FabI, FabK, e FabL, respectivamente) NADPH-dependente reduz *trans*-2-enoil-ACP para formar acil-ACP. Os ciclos subsequentes são iniciados pela condensação de malonil-ACP com acil-ACP por β -cetoacil-ACP sintase I ou β -cetoacil-ACP sintase II (FabB e FabF, respectivamente).

2. Modificações para a rota biossintética de ácido graxo para aumentar a produção de acil-ACP

[0184] Os hospedeiros de produção podem ser modificados para super-produzir acetil-CoA e malonil-CoA. Tais hospedeiros de produção incluem células de planta, de animal, de alga, de bactéria, de cianobactéria, de fungo ou de humanos. Células de micro-organismos, tais como, por exemplo, bactéria, cianobactéria, alga, levedura ou fungos filamentosos também podem ser usados como hospedeiros de produção. Exemplos não-limitativos de micro-organismos que podem ser usados como hospedeiros de produção incluem *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida lipolytica*, *Arthrobacter AK 19*, *Rhodotorula glutinins*, *Acinetobacter* sp. strain M-1, *Candida lipolytica*, e outros micro-organismos oleaginosos. Outros micro-organismos apropriados incluem, sem limitação, *Synechococcus* sp. PCC7002, *Synechococcus elongatus*. PCC7942, e *Synechocystis* sp. PCC6803. Diversas modificações diferentes podem ser feitas, em combinação ou individualmente, no hospedeiro de produção para obter produção aumentada de acetil-CoA/malonil-CoA/ácido graxo e derivado de ácido graxo.

[0185] Por exemplo, para aumentar a produção de acetil-CoA, um ou mais dos seguintes genes podem ser expressados em um hospedeiro de produção: *pdh*, *panK*, *aceEF* (codificante do componente E1p desidrogenase e do componente E2p diidrolipoamida aciltransferase dos complexos piruvato e 2-oxoglutarato desidrogenase), *fabH*, *fabD*, *fabG*, *acpP*, *fabF*. Em outros exemplos, a sequência de DNA adicional codificante de acil-CoA-graxo redutases e de aldeído descarbonilases podem ser expressados no hospedeiro de produção. É bem

conhecido no estado da técnica que pode ser construído um plasmídeo contendo um ou mais dos genes acima mencionados, todos sob o controle de um promotor constitutivo ou de outra maneira controlável. Números de acesso ao GenBank exemplificativos para esses genes são: *pdh* (BAB34380, AAC73227, AAC73226), *panK* (também conhecido como *coaA*, AAC76952), *aceEF* (AAC73227, AAC73226), *fabH* (AAC74175), *fabD* (AAC74176), *fabG* (AAC74177), *acpP* (AAC74178), *fabF* (AAC74179).

[0186] Adicionalmente, o nível de expressão de um gene de uma acil-CoA desidrogenase pode ser reduzido ou funcionalmente deletado no micro-organismo modificado por transformação com plasmídeos condicionalmente replicativos ou não-replicativos contendo mutações nulas ou de deleção do gene correspondente, ou por substituição das sequências de promotores ou *enhancer*. Em algumas concretizações, o gene de acil-CoA desidrogenase codifica uma enzima de, por exemplo, EC 1.3.99.3. Em concretizações particulares, o gene de acil-CoA desidrogenase é *fadE*.

[0187] Em algumas concretizações, o nível de expressão de um gene regulador de biossíntese de ácido graxo pode ser reduzido ou funcionalmente deletado no micro-organismo modificado por transformação com plasmídeos condicionalmente replicativos ou não-replicativos contendo mutações nulas ou de deleção do gene correspondente, ou por substituição de sequências de promotores ou *enhancer*. Em algumas concretizações, o gene regulador de biossíntese de ácido graxo é um repressor de transcrição, por exemplo, um repressor dos genes *fabA*, *fabB* e/ou *yqfA* (ver, por exemplo, McCue *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 29(3):774-82 (2001); Zhang

et al., *J. Biol. Chem.* 277 (18):15558-65 (2002)). Em concretizações particulares, o gene regulador de biossíntese de ácido graxo é um gene *fabR*.

[0188] Em outras concretizações, os níveis de expressão de um gene de piruvato oxidase (ver, por exemplo, Chang *et al.*, *J. Bacteriol.* 154(2):756-62 (1983); Abdel-Ahmid *et al.*, *Microbiol.* 147(6):2001)) podem ser reduzidos ou funcionalmente deletados no micro-organismo modificado por transformação com plasmídeos condicionalmente replicativos ou não-replicativos contendo mutações nulas ou de deleção dos genes correspondentes, ou por substituição de sequências de promotores ou de *enhancer*. Em algumas concretizações, o gene de piruvato oxidase é um gene *poxB*.

[0189] Em outras concretizações, os níveis de expressão de um gene de lactato desidrogenase (ver, por exemplo, Mat-Jan *et al.*, *J. Bacteriol.* 171(1):342-8; Bunch *et al.*, *Microbiol.* 143(1):187-95 (1997)) pode ser reduzido ou funcionalmente deletado no micro-organismo modificado por transformação com plasmídeos condicionalmente replicativos ou não-replicativos contendo mutações nulas ou de deleção do gene correspondente, ou por substituição de sequências de promotores ou de *enhancer*. Em algumas concretizações, o gene de lactato desidrogenase codifica uma enzima de, por exemplo, EC 1.1.1.27. Em concretizações particulares, o gene de lactato desidrogenase é um gene de D-lactato desidrogenase fermentativo NAD-ligado. Em concretizações adicionais, o gene de lactato desidrogenase é um gene *ldhA*.

[0190] Em certas concretizações, os níveis de expressão de *fadE*, *fabR*, *gpsA*, *ldhA*, *pflA*, *pflB*, *adhE*, *pta*, *poxB*, *ackA*, e/ou *ackB* podem ser reduzidos ou desligados no micro-

organismo modificado por transformação com plasmídeos condicionalmente replicativos ou não-replicativos contendo mutações nulas ou de deleção dos genes correspondentes, ou por substituição das sequências de promotor ou de *enhancer*. Números de acesso ao GenBank exemplificativos para esses genes são: *fadE* (AAC73325), *gspA* (AAC76632), *ldhA* (AAC74462), *pflA* (AP_001532), *pflB* (AAC73989), *adhE* (AAC74323), *pta* (AAC75357), *poxB* (AAC73958), *ackA* (AAC75356) e *ackB* (BAB81430). Os resultantes hospedeiros de produção modificados podem produzir níveis aumentados de acetil-CoA quando crescidos em um ambiente apropriado.

[0191] Além disso, a super-produção de malonil-CoA pode ser afetada pela modificação dos hospedeiros de produção como acima descrito com *accABCD* (por exemplo, número de acesso de AAC73296, EC 6.4.1.2) incluído no plasmídeo sintetizado de novo. A super-produção de ácido graxo pode ser alcançada por, adicionalmente, incluir uma sequência de DNA codificante de lipase (por exemplo, números de Acesso CAA89087, CAA98876) no plasmídeo sintetizado de novo.

[0192] Como resultado, em alguns exemplos, a acetil-CoA carboxilase pode ser superexpressada para aumentar a concentração intracelular da mesma por pelo menos cerca de 2 vezes, preferencialmente pelo menos cerca de 5 vezes, ou mais preferivelmente pelo menos cerca de 10 vezes com relação aos níveis de expressão natural.

[0193] Adicionalmente, pode ser usada a mutação D311E de *plsB* (por exemplo, número de Acesso AAC77011) para aumentar a quantidade de acil-CoA disponível.

[0194] Adicionalmente, a superexpressão de um gene *sfa* (supressor de FabA, por exemplo, número de Acesso AAN79592)

pode ser incluída nos hospedeiros de produção de ácidos graxos monoinsaturados (Rock *et al.*, *J. Bacteriology* 178:5382-5387 (1996)).

B. Acil-ACP para Ácido Graxo

1. Rota Biossintética de Ácido Graxo: Acil-ACP para Ácido Graxo

[0195] Como descrito acima, a acil-CoA e a malonil-CoA são processadas em diversas etapas para formar cadeias de acil-ACP. A enzima *sn*-glicerol-3-fosfate aciltransferase (PlsB) catalisa a transferência de um grupo acila da acil-ACP ou acil-CoA para a posição *sn*-1 do glicerol-3-fosfato. Assim, a PlsB é uma enzima reguladora na síntese de fosfolipídio, que é parte da rota de ácido graxo. A inibição da PlsB pode conduzir a um aumento nos níveis de acil-ACP de cadeia longa, cuja retroalimentação pode inibir as etapas preliminares na rota (por exemplo, *accABCD*, *fabH* e *fabI*). O desacoplamento desta regulação, por exemplo, por meio de superexpressão de tioésterase, pode levar a uma produção aumentada de ácido graxo. As famílias do gene *tes* e do gene *fat* expressam tioésterase. A FabI também pode ser inibida *in vitro* por meio de acil-CoA de cadeia-longa.

2. Modificações para a rota biossintética de ácido graxo para produzir ácidos graxos desejados

[0196] Para modificar um hospedeiro de produção para a produção de uma população homogênea de derivados de ácido graxo, um ou mais genes endógenos podem ser atenuados ou funcionalmente deletados e, como resultado, uma ou mais tioésterases podem ser expressadas. Por exemplo, derivados

de ácido graxo C_{10} podem ser produzidos por atenuação da tioésterase C_{18} (por exemplo, números de Acesso AAC73596 e P0ADA1), a qual usa $C_{18:1}$ -ACP e expressar tioésterase C_{10} (por exemplo, número de Acesso Q39513), a qual usa C_{10} -ACP. Isto pode resultar em uma população relativamente homogênea de derivados de ácido graxo que possuem comprimento de cadeia de carbono de 10. Em outro exemplo, derivados de ácido graxo C_{14} podem ser produzidos por atenuação de tioésterases endógenas que produzem ácidos graxos não- C_{14} e expressam a tioésterase de número de acesso Q39473 (a qual usa C_{14} -ACP). Ainda em outro exemplo, derivados de ácido graxo C_{12} podem ser produzidos por expressão de tioésterases que usam C_{12} -ACP (por exemplo, número de Acesso Q41635) e atenuação de tioésterases que produzem ácidos graxos não- C_{12} . Super-produção de acetil-CoA, de malonil-CoA e de ácido graxo pode ser verificada usando métodos conhecidos no estado da técnica, por exemplo, pelo uso de precursores radioativos, HPLC, e GC-MS subsequente à lise de células. Exemplos não-limitativos de tioésterases utilizáveis nos métodos e hospedeiros de produção reivindicados estão listados na Tabela 1.

Tabela 1: Tioésterases

Número de Acesso	Organismo Fonte	Gene	Produto preferencial produzido
AAC73596	<i>E. coli</i>	<i>tesA</i> sem sequência líder	C _{18:1}
AAC73555	<i>E. coli</i>	<i>tesB</i>	
Q41635, AAA34215	<i>Umbellularia californica</i>	<i>fatB</i>	C _{12:0}
Q39513; AAC49269	<i>Cuphea hookeriana</i>	<i>fatB2</i>	C _{8:0} - C _{10:0}
AAC49269; AAC72881	<i>Cuphea hookeriana</i>	<i>fatB3</i>	C _{14:0} - C _{16:0}
Q39473, AAC49151	<i>Cinnamomum camphorum</i>	<i>fatB</i>	C _{14:0}
CAA85388	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>fatB</i> [M141T]*	C _{16:1}
NP 189147; NP 193041	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>fata</i>	C _{18:1}
CAC39106	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>fata</i>	C _{18:1}
AAC72883	<i>Cuphea hookeriana</i>	<i>fata</i>	C _{18:1}
AAL79361	<i>Helianthus annuus</i>	<i>fata1</i>	

* Caner et al., *BMC Plant Biology* 7:1-11, 2007

C. Ácido Graxo para Acil-CoA

1. Conversão de Ácidos Graxos em Acil-CoA

[0197] A acil-CoA sintase (ACS) ésterifica ácidos graxos livres para acil-CoA por um mecanismo em duas etapas. O ácido graxo livre primeiramente é convertido em um intermediário de acil-AMP (um adenilato) através da pirofosforólise de ATP. O carbono ativado da carbonila do adenilato é depois acoplada ao grupo tiol de CoA, liberando AMP e o produto final acil-CoA (ver Shockey et al., *Plant. Physiol.* 129:1710-1722 (2002)).

[0198] A enzima de ACS de *E. coli* FadD e a proteína de transporte de ácido graxo FadL são componentes essenciais de

um sistema de captação de ácido graxo. A FadL media o transporte de ácidos graxos para a célula bacteriana, e a FadD media a formação de ésteres de acil-CoA. Quando nenhuma fonte de carbono está disponível, os ácidos graxos exógenos são captados pelas bactérias e convertidos em ésteres de acil-CoA, os quais podem se ligar ao fator de transcrição FadR e desreprimir a expressão dos genes *fad* que codificam proteínas responsáveis pelo transporte de ácido graxo (FadL), ativação (FadD) e β -oxidação (FadA, FadB, FadE e FadH). Quando fontes alternativas de carbono estiverem disponíveis, as bactérias sintetizam ácidos graxos como acil-ACPs, as quais são usadas para a síntese de fosfolipídios, mas não são substratos para a β -oxidação. Portanto, a acil-CoA e acil-ACP são ambas fontes independentes de ácidos graxos que podem resultar em diferentes produtos finais (ver Caviglia et al., *J. Biol. Chem.* 279(12):1163-1169 (2004)).

2. Modificação para aumentar a conversão de ácidos graxos em acil-CoA

[0199] Os hospedeiros de produção podem ser modificados usando peptídeos conhecidos para produzir ácidos graxos de vários comprimentos, os quais podem ser convertidos em acil-CoA. Um método exemplificativo inclui o aumento de expressão de, ou expressão de formas mais ativas de, um ou mais peptídeos acil-CoA sintase (EC 6.2.1.-). Uma lista de acil-CoA sintases que podem ser expressadas para produzir acil-CoA e derivados de ácido graxo é mostrada na Tabela 2.

Tabela 2: Acil-CoA sintases

Nome do Gene/ Locus	Fonte	NCBI ID	Identidade % com relação a FadD de <i>E. coli</i>	Similaridade % com relação a FadD de <i>E. coli</i>
<i>fadD</i>	<i>E. coli</i>	NP_416319	-	-
<i>fadK</i>	<i>E. coli</i>	YP_416216	45	27
<i>fadD</i>	<i>Acinetobacter sp. ADP1</i>	YP_045024	51	70
<i>fadD</i>	<i>Haemophilus influenza</i> <i>RdKW20</i>	NP_438551	64	78
BH3103	<i>Bacillus halodurans</i> <i>C-125</i>	NP_243969	40	58
<i>yhfL</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	NP_388908	39	57
Pfl-4354	<i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Pfo-1</i>	YP_350082	52	71
EAV15023	<i>Comamonas testosterone</i> <i>KF-1</i>	ZP_01520072	55	72
<i>fadD1</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NP_251989	54	72
<i>fadD2</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>PAO1</i>	NP_251990	55	72
<i>fadD</i>	<i>Rhizobium etli CFN42</i>	YP_533919	55	72
RPC_4074	<i>Rhodopseudomonas</i> <i>palustris Bis B18</i>	YP_533919	56	72
<i>fadD1</i>	<i>Rasltonia Solanacearum</i> <i>GMI 1000</i>	NP_520978	56	72
<i>fadDD35</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis H37Rv</i>	NP_217021	28	46
<i>fadDD22</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis H37Rv</i>	NP_217464	23	42
PRK0059	<i>Stenotrophomonas</i> <i>MaltophiliaR551-3</i>	ZP_01644857	59	75

[0200] Com base no seu grau de similaridade com relação à FadD de *E. coli*, foram selecionados os seguintes genes homólogos para serem sintetizados e avaliados: *fadDD35* oriundo de *M. tuberculosis* HR7Rv [NP_217021]; *yhfl* oriundo de *B. subtilis* [NP_388908]; *fadD1* oriundo de *P. aeruginosa* PAO1 [NP_251989]; e homólogo de *fadD*, Faa3p oriundo de *Saccharomyces cerevisiae* [NP_012257].

[0201] Acil-CoA sintases de ácido graxo adicionais, oriundas de organismos eucarióticos que podem ser usados para produzir acil-CoA, assim como derivados de ácidos graxos, incluem aqueles descritos em Shockey et al., *Plant. Physiol.* 129: 1710-1722 (2002) (*Arabidopsis*), Caviglia et al., *J. Biol. Chem.* 279: 1163-1169 (2004) (rato), e Knoll et al., *J. Biol. Chem.* 269(23):16348-56 (1994) (levedura). Sequências de gene codificantes dessas sintases são conhecidas no estado da técnica (ver, por exemplo, Johnson et al., *J. Biol. Chem.* 269: 18037-18046 (1994); Shockey et al., *Plant. Physiol.* 129: 1710-1722 (2002); Black et al., *J. Biol. Chem.* 267: 25513-25520 (1992)). Essas acil-CoA sintases eucarióticas, a despeito de sua falta de elevada homologia com as sequências de *fadD* de *E. coli*, podem complementar a atividade de FadD nos desligamentos de *fadD* de *E. coli*.

D. Acil-CoA para Álcool Graxo

1. Conversão de Acil-CoA para Álcool Graxo

[0202] Acil-CoA é reduzida para aldeído graxo por meio de acil-CoA redutase NADH-dependente (por exemplo, Acr1). O aldeído graxo é então reduzido para um álcool graxo por meio de álcool desidrogenase NADPH-dependente (por exemplo, YqhD). Alternativamente, a acil-CoA redutase formadora de

álcool graxo (FAR) catalisa a redução de uma acil-CoA para um álcool graxo e CoASH. FAR usa NADH ou NADPH como um cofactor nesta redução de quatro elétrons. Apesar de as reações FAR geradoras de álcool prosseguirem através de um aldeído intermediário, um aldeído livre não é liberado. Assim, as FARs formadoras de álcool são distintas daquelas enzimas que executam as reduções de dois-elétrons de acil-CoA e produzem aldeído graxo livre como um produto (ver Cheng *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 279(36):37789-37797 (2004); Metz *et al.*, *Plant Physiol.*, 122:635-644 (2000)).

2. Modificações para Aumentar a Conversão de Acil-CoA em Álcool Graxo

[0203] Os hospedeiros de produção podem ser modificados usando polipeptídeos conhecidos para produzir alcoóis graxos a partir de acil-CoA. Um método exemplificativo inclui o aumento da expressão de, ou expressão de formas mais ativas de, acil-CoA redutases formadoras de álcool (codifica por meio de um gene tal como *acr1* oriundo de FAR, EC 1.2.1.50/1.1.1) ou acil-CoA reductases (EC 1.2.1.50), assim como álcool desidrogenase (EC 1.1.1.1). Números de Acesso exemplificativos desses genes incluem, sem limitação, *acr1* [No. de Acesso no GenBank YP_047869, ou AAC45217]. Outros genes apropriados foram descritos, por exemplo, no Pedido de Patente Internacional PCT/US08/058788 (por exemplo, Figura 1), o qual é incorporado a título de referência.

[0204] Alcoóis graxos podem ser descritos como tensoativos baseados em hidrocarboneto. Para a produção de tensoativo, o hospedeiro de produção pode ser modificado para produzir um tensoativo a partir de uma fonte de carbono

renovável. Tal hospedeiro de produção pode incluir uma primeira sequência exógena de DNA codificante de uma proteína capaz de converter um ácido graxo em um aldeído graxo e uma segunda sequência exógena de DNA codificante de uma proteína capaz de converter um aldeído graxo em um álcool. Em alguns exemplos, a primeira sequência exógena de DNA pode codificar uma ácido graxo redutase. Em uma concretização, a segunda sequência exógena de DNA pode codificar uma aldeído microssômica de mamífero redutase ou aldeído de cadeia longa desidrogenase. Em um exemplo adicional, a primeira e a segunda sequências exógenas de DNA podem ser oriundas de *Arthrobacter* AK 19, *Rhodotorula glutinins*, *Acinetobacter* sp. strain M-1, ou *Candida lipolytica*. Em uma concretização, a primeira e a segunda sequências heterólogas de DNA podem ser oriundas de um complexo multienzima de *Acinetobacter* sp. cepa M-1 ou *Candida lipolytica*.

[0205] Fontes adicionais de sequências heterólogas de DNA codificantes de ácido graxo para proteínas conversoras de álcool de cadeia longa que podem ser usadas em produção de tensoativo incluem, mas não estão limitadas a, *Mortierella alpina* (ATCC 32222), *Cryptococcus curvatus*, (também referida como *Apiotricum curvatum*), *Alcanivorax jadensis* (T9T=DSM 12718=ATCC 700854), *Acinetobacter* sp. H01-N (ATCC 14987) e *Rhodococcus opacus* (PD630 DSMZ 44193).

[0206] Em um exemplo, o derivado de ácido graxo é um produto tensoativo saturado ou insaturado tendo um comprimento de cadeia de carbono desde cerca de 6 até cerca de 36 átomos de carbono, desde cerca de 8 até cerca de 30 átomos de carbono, desde cerca de 10 até cerca de 26 átomos de carbono, desde cerca de 12 até cerca de 20 átomos de

carbono, ou desde cerca de 12 até cerca de 16 átomos de carbono. Em outro exemplo, o produto tensoativo tem um comprimento de cadeia de carbono desde cerca de 10 até cerca de 18 átomos de carbono, ou desde cerca de 12 até cerca de 14 átomos de carbono.

[0207] Hospedeiros de produção apropriados para produzir tensoativos podem ser oriundos de micro-organismos eucarióticos ou procarióticos. Hospedeiros de produção exemplificativos incluem células de *Arthrobacter* AK 19, *Rhodotorula glutinins*, *Acinetobacter* sp cepa M-1, *Arabidopsis thaliana*, *Candida lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae*, e *E. coli* modificadas para expressar acetil-CoA carboxilase. Também podem ser usados hospedeiros de produção que sintetizam níveis elevados de precursores de tensoativo na forma de lipídios e óleos, tais como células de *Rhodococcus opacus*, *Arthrobacter* AK 19, e *Rhodotorula glutinins* *E. coli* modificadas para expressar acetil-CoA carboxilase, e outras bactérias oleaginosas, levedura e fungos.

IV. Engenharia Genética de Cepa de Produção para Aumentar a Produção de Etanol

[0208] Os hospedeiros de produção usados para produzir ésteres de ácido graxo, tais como FAEE, podem ser modificados recombinantemente para expressar ou superexpressar genes específicos, ou para atenuar a expressão de genes específicos, e, assim, permitir que os hospedeiros de produção produzam etanol ou aumentem a produção de etanol. Modificações recombinantes apropriadas para uso nos presentes métodos para produzir etanol ou para aumentar a

produção de etanol estão descritos em, por exemplo, Jarboe *et al.*, *Adv. Biochem. Engin./Biotechnol.* 108:237-261 (2007); Peterson & Ingram, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1125:363-372 (2008); e Yomano *et al.*, *Biotechnol. Lett.* 30:2097-2103 (2008), os quais são aqui incorporados a título de referência na sua integralidade.

[0209] Exemplos não-limitativos de genes que podem ser expressados ou superexpressados, ou atenuados para produzir etanol incluem *pdh* [por exemplo, No. de Acesso no GenBank YP_163095], *adh* [por exemplo, No. de Acesso no GenBank YP_162971], *adhA* [por exemplo, No. de Acesso no GenBank AAA71935], *adhB* [por exemplo, No. de Acesso no GenBank AAC70367], *pflA* [por exemplo, No. de Acesso no GenBank AP_001532], *pflB* [No. de Acesso no GenBank AAC73989], *casA* [por exemplo, No. de Acesso no GenBank AAB51563], *casB* [No. de Acesso no GenBank AAB51564], *frd* [por exemplo, No. de Acesso no GenBank AAT36479], *ldhA* [No. de Acesso no GenBank NP_415898], *adhE* [por exemplo, No. de Acesso no GenBank NP_415757], *ackA* [por exemplo, No. de Acesso no GenBank AAC75356], *focA* [por exemplo, No. de Acesso no GenBank NP_415424], entre outros. Especificamente, exemplos não-limitativos de genes que podem ser expressados ou superexpressados para produzir etanol ou aumentar a produção de etanol nos presentes métodos incluem *pdh*, *adh*, *adhA*, *adhB*, *pdh* e *casAB*. Exemplos não-limitativos de genes que podem ser atenuados para produzir etanol ou aumentar a produção de etanol nos presentes métodos incluem *frd*, *ldhA*, *pflA*, *pflB*, *adhE*, *ackA* e *focA*.

E. Engenharia Genética de Cepa de Produção para Aumentar a Produção de Etanol

[0210] Os hospedeiros de produção usados para produzir ésteres de ácido graxo, tais como FAEE, podem ser modificados recombinantemente para expressar ou superexpressar genes específicos, ou para atenuar a expressão de genes específicos, e, assim, permitir que hospedeiros de produção produzam etanol ou aumentem a produção de etanol. Modificações recombinantes apropriadas para uso nos presentes métodos para produzir etanol ou aumentar a produção de etanol estão descritos em, por exemplo, Jarboe *et al.*, *Adv. Biochem. Engin./Biotechnol.* 108:237-261 (2007); Peterson *et al.*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1125:363-372 (2008); e Yomano *et al.*, *Biotechnol. Lett.* 30:2097-2103 (2008), os quais são aqui incorporados a título de referência na sua integralidade.

[0211] Especificamente, exemplos não-limitativos de genes que podem ser expressados ou superexpressados para produzir etanol ou aumentar a produção de etanol nos presentes métodos incluem *pdh*, *adh*, *adhA*, *adhB*, *pdh* e *casAB*. Exemplos não-limitativos de genes que podem ser atenuados para produzir etanol ou aumentar a produção de etanol nos presentes métodos incluem *frd*, *ldhA*, *pflA*, *pflB*, *adhE*, *ackA* e *focA*.

F. Alcoóis Graxos para Ésteres Graxos

[0212] Podem ser modificados hospedeiros de produção usando polipeptídeos conhecidos para produzir ésteres graxos de vários comprimentos. Um método exemplificativo inclui aumentar a expressão de, ou expressar formas mais ativas de,

um ou mais peptídeos álcool O-acetiltransferase (EC 2.3.1.84). Esses peptídeos catalisam a acetilação de um álcool por conversão de uma acetil-CoA e um álcool para uma CoA e um éster. Em alguns exemplos, os peptídeos álcool O-acetiltransferase podem se expressados em conjunto com peptídeos tioésterase selecionados, peptídeos FAS, e peptídeos formadores de ácido graxo, permitindo assim que o comprimento da cadeia de carbono, a saturação e o grau de ramificação sejam controlados. Em alguns casos, o operon *bkd* pode ser coexpressado para possibilitar a produção de precursores de ácido graxo ramificado.

[0213] Como aqui usado, os peptídeos álcool O-acetiltransferase incluem peptídeos em número de classificação de enzimas EC 2.3.1.84, assim como qualquer outro peptídeo capaz de catalisar a conversão de acetil-CoA e um álcool para formar uma CoA e um éster. Adicionalmente, uma pessoa versada na técnica saberá apreciar que peptídeos álcool O-acetiltransferase catalisarão outras reações.

[0214] Por exemplo, peptídeos álcool O-acetiltransferase aceitam outros substratos em adição aos alcoóis graxos ou acetil-CoA tioéster, tal como outros alcoóis e outros acil-CoA tioésteres. Tais peptídeos álcool O-acetiltransferase não-específicos ou de especificidade-divergente estão, portanto, também incluídos. As sequências de peptídeo álcool O-acetiltransferase estão disponíveis ao público. Genes exemplificativos codificantes de álcool O-acetiltransferases incluem, sem limitação, *aat* [No. de Acesso no GenBank AAG13130]. Outras O-acetiltransferases foram descritas, por exemplo, no Pedido de Patente

Internacional PCT/US08/058788, (por exemplo, Figura 1) o qual é aqui incorporado a título de referência.

[0215] Os ensaios para caracterizar a atividade de peptídeos particulares álcool *O*-acetiltransferase são bem conhecidos no estado da técnica. As *O*-aciltransferases podem ser modificadas para ter novas atividades e especificidades para o grupo doador acila ou componente receptor álcool. Enzimas modificadas podem ser geradas através de abordagens racionais e evolutivas bem documentadas.

G. Acil-CoA para Ésteres Graxos

1. Produção de Ésteres Graxos

[0216] Ésteres graxos são sintetizados por meio de acil-CoA: álcool aciltransferase graxo (por exemplo, éster sintase), a qual conjuga um álcool a uma acil-CoA graxo via uma ligação éster. Éster sintases e genes codificantes são conhecidos a partir da planta jojoba e da bactéria *Acinetobacter* sp. cepa ADP1 (formalmente *Acinetobacter calcoaceticus* ADP1). A éster sintase bacteriana é uma enzima bifuncional, apresentando atividade de éster sintase e a capacidade para formar triacilgliceróis a partir de substratos de diacilglicerol e acil-CoAs graxo (atividade acil-CoA: diglicerol aciltransferase (DGAT)). O gene *wax/dgat* codifica ambos a éster sintase e a DGAT (ver Cheng et al., *J. Biol. Chem.* 279(36):37798-37807, 2004; Kalscheuer and Steinbuchel, *J. Biol. Chem.* 278:8075-8082, 2003). Éster sintases também podem ser usadas para produzir certos ésteres graxos que podem ser usados como combustível, tal como biodiesel, como aqui descrito.

2. Modificações para Produzir Ésteres Graxos

[0217] Ésteres graxos, incluindo parafinas, podem ser produzidos a partir de acil-CoA e alcoóis usando polipeptídeos conhecidos. Um método exemplificativo inclui aumentar a expressão de, ou expressar formas mais ativas de, uma ou mais éster sintases (EC 2.3.1.20, 2.3.1.75). As sequências peptídicas de éster sintase estão disponíveis ao público, inúmeras das quais foram descritas, por exemplo, no Pedido de Patente Internacional PCT/US08/058788 (por exemplo, Figura 1) o qual é aqui incorporado a título de referência. Métodos para identificar a atividade de éster sintase são providos, por exemplo, na patente US 7.118.896, a qual é aqui incorporada a título de referência na sua integralidade.

[0218] Em exemplos particulares, se o produto desejado for um biocombustível baseado em éster, o hospedeiro de produção é modificado de modo que ele produza um éster gerado a partir de uma fonte renovável de energia. Tal hospedeiro de produção pode incluir uma sequência exógena de DNA codificante de uma éster sintase que é expressada de modo a conferir ao dito hospedeiro de produção a capacidade de sintetizar um éster graxo saturado, insaturado ou ramificado a partir de uma fonte renovável de energia. Em algumas concretizações, o organismo também pode expressar sequência de DNA codificante das seguintes proteínas exemplificativas: ácido graxo elongases, acil-CoA redutases, aciltransferases, éster sintases, graxo acil transferases, diacilglicerol aciltransferases, acil-coA parafina álcool aciltransferases. Em uma concretização alternativa, o organismo pode expressar uma sequência de DNA codificante de uma éster sintase/acil-

CoA:diacilglicerol aciltransferase bifuncional. Por exemplo, a éster sintase/acil-CoA:diacilglicerol aciltransferase bifuncional pode ser selecionada dos complexos multienzima oriundos de *Simmondsia chinensis*, *Acinetobacter* sp. cepa ADP1 (formalmente *Acinetobacter calcoaceticus* ADP1), *Alcanivorax borkumensis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Fundibacter jadensis*, *Arabidopsis thaliana*, ou *Alcaligenes eutrophus* (mais tarde renomeada *Ralstonia eutropha*). Em uma concretização, as ácido graxo elongases, acil-CoA redutases ou parafina sintases podem ser oriundas de um complexo multienzima de *Alcaligenes eutrophus* (mais tarde renomeada *Ralstonia eutropha*) ou outros organismos conhecidos na literatura por produzir ésteres, tais como ésteres parafínicos ou graxos.

[0219] Fontes adicionais de sequência heteróloga de DNA codificante de proteínas de síntese de éster que podem ser usadas em produção de éster graxo incluem, mas não estão limitadas a, *Mortierella alpina* (por exemplo, ATCC 32222), *Cryptococcus curvatus* (também referida como *Apiotricum curvatum*), *Alcanivorax jadensis* (por exemplo, T9T=DSM 12718 =ATCC 700854), *Acinetobacter* sp. H01-N, (por exemplo, ATCC 14987) e *Rhodococcus opacus* (por exemplo, PD630, DSMZ 44193).

[0220] Hospedeiros de produção para produzir ésteres graxos podem ser micro-organismos eucarióticos ou procarióticos. Exemplos não limitativos de hospedeiros de produção para produzir ésteres graxos incluem *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida lipolytica*, *E. coli* *Arthrobacter* AK 19, *Rhodotorula glutinins*, *Acinetobacter* sp. cepa M-1, *Candida lipolytica*, e outros micro-organismos oleaginosos.

[0221] Em uma circunstância, é usada a éster sintase oriunda de *Acinetobacter* sp. ADP1 no locus AAO17391 (descrita em Kalscheuer *et al.*, *J. Biol. Chem.* 278:8075-8082 (2003), aqui incorporado a título de referência). Em outra circunstância, é usada a éster sintase oriunda de *Simmondsia chinensis* no locus AAD38041. Opcionalmente, pode ser usado um exportador de éster tal como um membro da família de FATP para facilitar a liberação dos ésteres para o ambiente extracelular. Um exemplo não-limitativo de um exportador de éster que pode ser usado é a proteína transportadora de ácido graxo (cadeia longa) CG7400-PA, isoforma A, oriunda de *Drosophila melanogaster*, no locus NP_524723.

H. Produção Melhorada de FAEE

[0222] Para melhorar a produção de FAEE, o hospedeiro de produção pode ser modificado para superexpressar um gene codificante de uma tioésterase, um gene codificante de uma acil-CoA sintase, e um gene codificante de éster sintase. A péster sintase pode ser uma graxo éster sintase/acil-CoA:diacilglicerol aciltransferase bifuncional. Genes exemplificativos de éster graxo sintase/acil-CoA:diacilglicerol aciltransferase bifuncional incluem, sem limitação, *atfA1* [No. de Acesso no GenBank AAO17391], assim como aquelas descritas, por exemplo, no Pedido de Patente Internacional PCT/US08/058788 (por exemplo, Figura 1), o qual é aqui incorporado a título de referência.

[0223] Para melhorar a produção de FAEE, qualquer um ou qualquer combinação de *fadE*, *fabR*, *poxB*, *pflA*, *pflB*, 4 *ldhA* podem opcionalmente ser atenuados, deletados, funcionalmente deletados ou desligados. Números de Acesso no GenBank

exemplificativos desses genes incluem, sem limitação, *fabR* [No. de Acesso no GenBank NP_418398], *fadE* [No. de Acesso no GenBank AAC73325], *poxB* [No. de Acesso no GenBank AAC73958 ou NP_415392], *pflA* [No. de Acesso no GenBank AP_001532], *pflB* [No. de Acesso no GenBank AAC73989], e *ldhA* [No. de Acesso no GenBank AAC74462 ou NP_415898], assim como aqueles descritos, por exemplo, no Pedido de Patente Internacional PCT/US08/058788 (por exemplo, Figura 1), o qual é aqui incorporado a título de referência. Exemplos não-limitativos de hospedeiros de produção em *E. coli* apropriados para uso no presente método incluem cepa de *E. coli* ID1 (MG1655 $\Delta fadE$ com um operon contendo os genes *tesA*, *fadD* e *atfA1* integrado no cromossomo sob o controle do promotor Trc) e cepa de *E. coli* $\Delta 4$ (MG1655 $\Delta fadE \Delta fabR \Delta poxB \Delta ldhA$ transportando um plasmídeo contendo *tesA*, *fadD* e *atfA1*).

I. Liberação de Derivados de Ácido Graxo – Proteínas de Transporte

[0224] As proteínas de transporte podem exportar derivados de ácido graxo para fora do hospedeiro de produção e para dentro do meio de cultura. Muitas proteínas de transporte e de efluxo servem para excretar uma grande variedade de compostos e podem ser modificadas para serem seletivas para tipos particulares de derivados de ácido graxo. Exemplos não-limitativos de proteínas de transporte apropriadas incluem proteínas de transporte do Cassete de Ligação-a-ATP (ABC), proteínas de efluxo, e proteínas transportadoras de ácido graxo (FATP). Exemplos não-limitativos adicionais de proteínas de transporte incluem as proteínas de transporte ABC oriundas de organismos tais como

Caenorhabditis elegans, *Arabidopsis thaliana*, *Alkaligenes eutrophus*, *Rhodococcus erythropolis*. Proteínas de transporte ABC exemplificativas incluem CER5, AtMRP5, AmiS2 e AtPGP1. Em uma concretização preferida, a proteína de transporte ABC é CER5 [por exemplo, No. de Acesso no GenBank AY734542]. Outras proteínas de transporte exemplificativas incluem, sem limitação, AtMRP5 [No. de Acesso no GenBank NP_171908], AmiS2 [No. de Acesso JC5491], AtPGP1 [No. de Acesso no GenBank NP_181228], assim como aquelas descritas, por exemplo, no Pedido de Patente Internacional PCT/US08/058788 (por exemplo, Figura 1), o qual é aqui incorporado a título de referência. Vetores contendo genes que expressam proteínas de transporte apropriadas podem ser inseridos em um hospedeiro de produção para aumentar a liberação de derivados de ácido graxo.

[0225] Podem ser escolhidos hospedeiros de produção pela sua capacidade endógena de liberar derivados de ácido graxo. A eficiência de produção e liberação de produto no mosto de fermentação pode ser expressa como uma razão de produto intracelular para produto extracelular. Em alguns exemplos, a razão pode ser de cerca de 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, ou 1:5.

II. Seleção de Características de Cadeia de Carbono de Derivados de Ácido Graxo

[0226] Podem ser produzidos derivados de ácido graxo com pontos de ramificação particular, níveis de saturação, comprimento de cadeia de carbono e características de éster. Podem ser escolhidos micro-organismos que naturalmente produzem derivados particulares. Alternativamente, micro-

organismos podem ser modificados geneticamente para expressar genes que codificam enzimas que podem produzir derivados de ácido graxo particulares. Exemplos não-limitativos de enzimas e de genes que podem ser usados sozinhos ou em combinação para produzir derivados de ácido graxo com características desejadas foram descritos, por exemplo, no Pedido de Patente Internacional PCT/US08/058788 (por exemplo, Figura 1), o qual é aqui incorporado a título de referência.

[0227] Em alguns exemplos, a expressão de genes exógenos de FAS oriundos de diferentes espécies ou variantes modificadas pode ser introduzida no hospedeiro de produção para resultar na biossíntese de ácidos graxos que são estruturalmente diferentes (em comprimento, ramificação, grau de insaturação, etc.) em comparação com aqueles do hospedeiro de produção natural. Esses produtos de gene heterólogo também podem ser escolhidos ou modificados para não serem afetados pelos mecanismos de regulação natural no hospedeiro de produção, e, portanto, permitir o controle da produção do produto comercial desejado. Por exemplo, as enzimas FAS oriundas de *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Streptomyces* spp., *Ralstonia*, *Rhodococcus*, *Corynebacteria*, *Brevibacteria*, *Mycobacteria*, levedura oleaginosa, e semelhantes podem ser expressadas no hospedeiro de produção. A expressão de tais enzimas exógenas pode alterar a estrutura do ácido graxo produzido.

[0228] Quando o hospedeiro de produção é modificado para produzir um ácido graxo com um nível específico de insaturação, ramificação, ou comprimento de cadeia de carbono, o ácido graxo modificado resultante pode ser usado

na produção de derivados de ácido graxo. Os derivados de ácido graxo gerados a partir de tais hospedeiros de produção podem apresentar as características do ácido graxo modificado.

[0229] Por exemplo, o hospedeiro de produção pode ser modificado para produzir ácidos graxos de cadeia ramificada curta, os quais podem ser usados pelo hospedeiro de produção para produzir alcoóis graxos de cadeia ramificada curta. Semelhantemente, um hidrocarboneto pode ser produzido pela modificação de um hospedeiro de produção para produzir um ácido graxo tendo um nível definido de ramificação, insaturação e/ou comprimento de cadeia de carbono, produzindo, assim, uma população de hidrocarbonetos homogêneos. Podem ser empregadas etapas adicionais para melhorar a homogeneidade do produto resultante. Por exemplo, quando um álcool insaturado, éster graxo ou hidrocarboneto é desejado, o hospedeiro de produção pode ser modificado para produzir baixos níveis de ácidos graxos saturados e, adicionalmente, pode ser modificado para expressar uma desaturase adicional e, assim, reduzir a produção de produto saturado.

A. Componentes Ramificados e Cíclicos

1. Modificação de Derivados de Ácidos Graxos Ramificados e Cíclicos

[0230] Ácidos graxos são intermediários chave na produção de derivados de ácido graxo. Podem ser produzidos derivados de ácido graxo que contêm pontos de ramificação, componentes cíclicos e combinações dos mesmos, pelo uso de

ácidos graxos ramificados ou cíclicos para produzir os derivados de ácido graxo.

[0231] Por exemplo, *E. coli* naturalmente produz ácidos graxos de cadeia reta (sFAs). Para modificar *E. coli* para produzir ácidos graxos de cadeia ramificada (brFAs), podem ser introduzidos diversos genes que fornecem precursores ramificados (por exemplo, operon *bkd*) no hospedeiro de produção e expressados para permitir a iniciação de biossíntese de ácido graxo a partir de precursores ramificados (por exemplo, *fabH*). Por exemplo, as famílias de genes *bkd*, *ilv*, *icm*, e/ou *fab* podem ser expressadas ou superexpressadas para produzir derivados de ácido graxo ramificado. Semelhantemente, para produzir ácidos graxos cíclicos, podem ser introduzidos genes que fornecem precursores cíclicos no hospedeiro de produção e expressados para permitir a iniciação da biossíntese de ácido graxo a partir de precursores cíclicos. Famílias de genes *ans*, *chc*, e *plm* podem ser expressadas ou superexpressadas para produzir ácidos graxos cíclicos. Exemplos não-limitativos de genes nessas famílias de genes incluem *ansJ*, *ansK*, *ansL*, *chcA* [No. de Acesso no GenBank U72144, ou AAQ84160], *ansM*, *plmJ* [No. de Acesso no GenBank AAQ84158], *plmK* [No. de Acesso no GenBank AAQ84158], *plmL* [No. de Acesso no GenBank AAQ84159], *plmM* [No. de Acesso no GenBank AAQ84161], *chcB* [No. de Acesso no GenBank AF268489], assim como outros incluindo aqueles descritos, por exemplo, no Pedido de Patente Internacional PCT/US08/058788 (por exemplo, Figura 1), o qual é aqui incorporado a título de referência.

[0232] Adicionalmente, o hospedeiro de produção pode ser modificado para expressar genes codificantes de

proteínas para o alongamento de brFAs (por exemplo, ACP, FabF, etc.) e/ou para deletar ou atenuar os correspondentes genes de *E. coli* que normalmente levam a sFAs. A este respeito, os genes endógenos que podem competir com os genes introduzidos (por exemplo, *fabH*, *fabF*) são deletados ou atenuados.

[0233] A acil-CoA ramificada (por exemplo, 2-metil-butiril-CoA, isovaleril-CoA, isobutiril-CoA, etc.) são os precursores de brFA. Na maioria dos micro-organismos contendo brFA, os brFA são sintetizados em duas etapas a partir de aminoácidos ramificados (por exemplo, isoleucina, leucina e valina) (Kadena, *Microbiol. Rev.* 55:288 (1991)). Um hospedeiro de produção pode ser modificado para expressar ou superexpressar uma ou mais das enzimas envolvidas nessas duas etapas para produzir brFAs, ou para super-produzir brFAs. Por exemplo, o hospedeiro de produção pode ter uma enzima endógena que pode realizar uma etapa que conduz a brFA, portanto, somente genes codificantes de enzimas envolvidas na segunda etapa precisam ser introduzidas recombinantemente.

2. Formação de Ácidos Graxos Ramificados e Derivados de Ácidos Graxos Ramificados

[0234] A primeira etapa na formação de brFAs é a produção dos correspondentes α -cetoácidos por meio de uma aminoácido aminotransferase de cadeia ramificada. Os hospedeiros de produção podem, de modo endógeno, incluir genes codificantes de tais enzimas ou tais genes podem ser introduzidos de modo recombinante. *E. coli*, por exemplo, expressa de modo endógeno tal enzima, IlvE (EC 2.6.1.42;

Acesso no GenBank YP_026247). Em alguns hospedeiros de produção, uma aminoácido aminotransferase heteróloga de cadeia ramificada não pode ser expressada. Entretanto, *E. coli* IlvE ou qualquer outra aminoácido aminotransferase de cadeia ramificada (por exemplo, IlvE oriunda de *Lactococcus lactis* (Acesso ao GenBank AAF34406), IlvE oriunda de *Pseudomonas putida* (Acesso ao GenBank NP_745648), ou IlvE oriunda de *Streptomyces coelicolor* (Acesso ao GenBank NP_629657)), se não for endógena, pode ser introduzida. Se a reação de aminotransferase for limitante de taxa na biossíntese de brFA no hospedeiro de produção escolhido, então a aminotransferase pode ser superexpressada.

[0235] A segunda etapa é a descarboxilação oxidativa dos α -cetoácidos para a correspondente acil-CoA de cadeia ramificada. Esta reação pode ser catalisada por um complexo de α -cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada (*bkd*; EC 1.2.4.4.) (Denoya et al., *J. Bacteriol.* 177:3504 (1995)), que consiste em E1 α/β (descarboxilase), E2 (diidrolipoil transacilase) e subunidades E3 (diidrolipoil desidrogenase). Esses complexos de α -cetoácido desidrogenase de cadeia ramificada são semelhantes aos complexos de piruvato e α -cetoglutarato desidrogenase. Cada micro-organismo que possui brFAs e/ou que cresce em aminoácidos de cadeia ramificada pode ser usado como uma fonte para isolar genes *bkd* para expressão em hospedeiros de produção, tais como, por exemplo, *E. coli*. Além disso, *E. coli* possui o componente E3 como parte de seu complexo de piruvato desidrogenase (*lpd*, EC 1.8.1.4, Acesso ao GenBank NP_414658). Em alguns métodos, somente os genes E1 α/β e E2 *bkd* são expressados no hospedeiro de produção. A Tabela 3 relaciona exemplos não-

limitativos de genes *bkd* oriundos de diversos micro-organismos que podem ser recombinantemente introduzidos e expressados em um hospedeiro de produção para fornecer precursores de acil-CoA de cadeia ramificada. Também podem ser usados micro-organismos tendo tais genes *bkd* como hospedeiros de produção.

Tabela 3: Genes *Bkd* oriundos de micro-organismos selecionados

Organismo	Gene	No Acesso ao GenBank
<i>Streptomyces coelicolor</i>	<i>bkdA1</i> (E1 α)	NP_628006
	<i>bkdB1</i> (E1 β)	NP_628005
	<i>bkdC1</i> (E2)	NP_628004
<i>Streptomyces coelicolor</i>	<i>bkdA2</i> (E1 α)	NP_733618
	<i>bkdB2</i> (E1 β)	NP_628019
	<i>bkdC2</i> (E2)	NP_628018
<i>Streptomyces avermitilis</i>	<i>bkdA</i> (E1a)	BAC72074
	<i>bkdB</i> (E1b)	BAC72075
	<i>bkdC</i> (E2)	BAC72076
<i>Streptomyces avermitilis</i>	<i>bkdF</i> (E1 α)	BAC72088
	<i>bkdG</i> (E1 β)	BAC72089
	<i>bkdH</i> (E2)	BAC72090
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>bkdAA</i> (E1 α)	NP_390288
	<i>bkdAB</i> (E1 β)	NP_390288
	<i>bkdB</i> (E2)	NP_390288
<i>Pseudomonas putida</i>	<i>bkdA1</i> (E1 α)	AAA65614
	<i>bkdA2</i> (E1 β)	AAA65615
	<i>bkdC</i> (E2)	AAA65617

[0236] Em outro exemplo, a isobutiril-CoA pode ser produzida em um hospedeiro de produção, por exemplo, em *E. coli*, através da coexpressão de uma crotonil-CoA redutase (Ccr, EC 1.6.5.5, 1.1.1.1) e isobutiril-CoA mutase

(subunidade grande IcmA, EC 5.4.99.2; subunidade pequena IcmB, EC 5.4.99.2) (Han e Reynolds, *J. Bacteriol.* 179:5157, 1997). A crotonil-CoA é um intermediário na biossíntese de ácido graxo em *E. coli* e em outros micro-organismos. Exemplos não-limitativos de genes *ccr* e *icm* oriundos de micro-organismos selecionados são dados na Tabela 4.

Tabela 4: Genes *ccr* e *icm* oriundos de micro-organismos selecionados

Organismo	Gene	No Acesso ao GenBank
<i>Streptomyces coelicolor</i>	<i>Ccr</i>	NP_630556
	<i>icmA</i>	NP_629554
	<i>icmB</i>	NP_630904
<i>Streptomyces cinnamonensis</i>	<i>ccr</i>	AAD53915
	<i>icmA</i>	AAC08713
	<i>icmB</i>	AJ246005

[0237] Adicionalmente à expressão dos genes *bkd*, a iniciação de biossíntese de brFA utiliza a proteína portadora de β -cetoacil-acil sintase III (FabH, EC 2.3.1.41) com especificidade para acil-CoAs de cadeia ramificada (Li et al., *J. Bacteriol.* 187:3795-3799, 2005). Exemplos não-limitativos de tais enzimas FabH estão listados na Tabela 5. Os genes *fabH* que estão envolvidos na biossíntese de ácido graxo de qualquer micro-organismo contendo brFA podem ser expressados em um hospedeiro de produção. As enzimas Bkd e FabH oriundas de hospedeiros de produção que não produzem naturalmente brFA não podem sustentar a produção de brFA, portanto, Bkd e FabH podem ser expressadas recombinantemente. Vetores contendo os genes *bkd* e *fabH* podem

ser inseridos em tal hospedeiro de produção. Semelhantemente, o nível endógeno de produção de Bkd e de FabH não pode ser suficiente para produzir brFA, portanto, eles podem ser superexpressados. Adicionalmente, outros componentes de rota de biossíntese de ácido graxo podem ser expressados ou superexpressados, tais como as proteínas portadoras de acila (ACPs) e a proteína portadora de β -cetoacil-acil sintase II (*fabF*, EC 2.3.1.41) (exemplos não-limitativos de candidatos são listados na Tabela). Adicionalmente à expressão desses genes, alguns genes na rota de biossíntese de ácido graxo endógena podem ser atenuados no hospedeiro de produção. Genes codificantes de enzimas que podem competir, com relação ao substrato, com as enzimas da rota que resulta na produção de brFA podem ser atenuados para aumentar a produção de brFA. Por exemplo, em *E. coli*, os candidatos mais prováveis para interferir com a biossíntese de brFA são os genes *fabH* (Acesso ao GenBank # NP_415609) e/ou *fabF* (Acesso ao GenBank # NP_415613).

Tabela 5: Genes *FabH*, *ACP* e *fabF* oriundos de micro-organismos selecionados com brFAs

Organismo	Gene	No Acesso ao GenBank
<i>Streptomyces coelicolor</i>	<i>fabH1</i> <i>ACP</i> <i>fabF</i>	NP_626634 NP_626635 NP_626636
<i>Streptomyces avermitilis</i>	<i>fabH3</i> <i>fabC3 (ACP)</i> <i>fabF</i>	NP_823466 NP_823467 NP_823468
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>fabH_A</i> <i>fabH_B</i> <i>ACP</i> <i>fabF</i>	NP_389015 NP_388898 NP_389474 NP_389016
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	SmalDRAFT_0818 (<i>FabH</i>) SmalDRAFT_0821 (<i>ACP</i>) SmalDRAFT_0822 (<i>FabF</i>)	ZP_01643059 ZP_01643063 ZP_01643064
<i>Legionella pneumophila</i>	<i>FabH</i> <i>ACP</i> <i>fabF</i>	YP_123672 YP_123675 YP_123676

[0238] Como mencionado acima, os alcoóis de cadeia ramificada podem ser produzidos através da combinação de genes de expressão que sustentam a síntese de brFA e a síntese de álcool. Por exemplo, quando uma álcool redutase, tal como *Acr1* oriunda de *Acinetobacter baylyi* ADP1, é coexpressada com um operon *bkd*, a *E. coli* pode sintetizar isopentanol, isobutanol ou 2-metil butanol. Semelhantemente, quando *Acr1* é coexpressada com genes *ccr/icm*, a *E. coli* pode sintetizar isobutanol.

2. Formação de ácidos graxos cíclicos e derivados de ácidos graxos cíclicos

[0239] Para converter um hospedeiro de produção tal como célula de *E. coli* em uma célula capaz de sintetizar ácidos graxos ω -cíclicos (cyFA), é introduzido um gene que fornece o precursor cíclico ciclo-hexilcarbonil-CoA (CHC-CoA) (Cropp et al., *Nature Biotech.* 18:980-983, 2000) e expressado no hospedeiro de produção. Uma conversão semelhante é possível para outros hospedeiros de produção, por exemplo, células de bactéria, de levedura, de cianobactéria e de fungos filamentosos.

[0240] Exemplos não-limitativos de genes que fornecem CHC-CoA em *E. coli* incluem: *ansJ*, *ansK*, *ansL*, *chcA* e *ansM* oriundos do aglomerado de gene de ansatrienina de *Streptomyces collinus* (Chen et al., *Eur. J. Biochem.* 261: 98-107 (1999)) ou *plmJ*, *plmK*, *plmL*, *chcA* e *plmM* oriundos do aglomerado de gene de foslactomicina B de *Streptomyces* sp. HK803 (Palaniappan et al., *J. Biol. Chem.* 278:35552-35557 (2003)) juntamente com o gene *chcB* g (Patton et al., *Biochem.* 39:7595-7604 (2000)) oriundo de *S. collinus*, *S. avermitilis* ou *S. coelicolor* (ver Tabela 6 relativa aos números de Acesso no GenBank). Os genes listados na Tabela 5 podem ser expressados para permitir a iniciação e o alongamento de ácidos graxos ω -cíclicos. Alternativamente, os genes homólogos podem ser isolados de micro-organismos que produzem cyFA e expressados em *E. coli*.

Tabela 6: Genes para a síntese de CHC-CoA

Organismo	Gene	No de Acesso ao GenBank
<i>Streptomyces collinus</i>	<i>ansJK</i>	U72144*
	<i>ansL</i>	
	<i>chcA</i>	
	<i>ansM</i>	
	<i>chcB</i>	AF268489
<i>Streptomyces</i> sp. HK803	<i>pmlJK</i>	AAQ84158
	<i>pmlL</i>	AAQ84159
	<i>chcA</i>	AAQ84160
	<i>pmlM</i>	AAQ84161
<i>Streptomyces coelicolor</i>	<i>chcB/caiD</i>	NP_629292
<i>Streptomyces avermitilis</i>	<i>chcB/caiD</i>	NP_629292

*Somente *chcA* está anotado na entrada do GenBank U72144, *ansJKLM* estão de acordo com Chen et al. (Eur. J. Biochem. 261:98-107 (1999)).

[0241] Os genes listados na Tabela 5 (*fabH*, *ACP* and *fabF*) são suficientes para permitir a iniciação e alongamento de ácidos graxos ω -cíclicos porque eles podem ter ampla especificidade para o substrato. Se a coexpressão de qualquer um desses genes com os genes *ansJKLM/chcAB* ou *pmlJKLM/chcAB* da Tabela 5 não produzir cyFA, então os homólogos *fabH*, *ACP* e/ou *fabF* oriundos de micro-organismos que produzem cyFAs podem ser isolados (por exemplo, pelo uso de *primers* degenerados de PCR *primers* ou de sondas de sequência heteróloga de DNA) e co-expressados. A Tabela 7 lista exemplos não-limitativos de micro-organismos que contêm ácidos graxos ω -cíclicos.

Tabela 7: Exemplos não-limitativos de micro-organismos que contêm ácidos graxos ω -cíclicos

Organismo	Referência
<i>Curtobacterium pusillum</i>	ATCC19096
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	ATCC49025
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	ATCC27009
<i>Alicyclobacillus cycloheptanicus</i> *	Moore, J. <i>Org. Chem.</i> 62:pp. 2173, 1997.

*Usa cicloheptilcarbonil-CoA e não ciclohexilcarbonil-CoA como precursor para a biossíntese de cyFA.

B. Saturação

[0242] Ácidos graxos são intermediários chave na produção de derivados de ácido graxo. O grau de saturação em derivados de ácido graxo pode ser controlado pela regulação do grau de saturação dos intermediários de ácido graxo. As famílias de genes *sfa*, *gns*, e *fab* podem ser expressadas ou superexpressadas para controlar a saturação de ácidos graxos. Genes exemplificativos dessas famílias incluem, sem limitação, *sfa* [Nos. De Acesso no GenBank AAN79590, ACC44390]; *gnsA* [No. de Acesso no GenBank ABD 18647.1], *gnsB* [No. de Acesso no GenBank AAC74076.1], *fabB* [No. de Acesso no GenBank BAA16180], *fabK* [No. de Acesso no GenBank AAF98273], *fabL* [No. de Acesso no GenBank AAU39821], e *fabM* [No. de Acesso no GenBank DAA05501], assim como aqueles descritos, por exemplo, no Pedido de Patente Internacional PCT/US08/058788 (por exemplo, Figura 1), o qual é aqui incorporado a título de referência.

[0243] Hospedeiros de produção podem ser modificados para produzir ácidos graxos insaturados por modificação do hospedeiro de produção para superexpressar *fabB*, ou por crescimento do hospedeiro de produção em temperaturas baixas (por exemplo, menos que 37°C). FabB tem preferência com relação à *cis*- δ^3 decenoil-ACP e resulta em produção de ácido graxo insaturado em *E. coli*. A superexpressão de *fabB* resulta na produção de uma percentagem significativa de ácidos graxos insaturados (de Mendoza *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 258:2098-101 (1983)). *fabB* pode ser inserido dentro e expressado em hospedeiros de produção que naturalmente não possuem o gene. Esses ácidos graxos insaturados podem então ser usados como intermediários para produzir derivados de ácido graxo, tais como alcoóis graxos, ésteres graxos, parafinas, olefinas, alcanos e semelhantes.

[0244] Alternativamente, o repressor de biossíntese de ácido graxo, por exemplo, *fabR* (Acesso no GenBank NP_418398), pode ser deletado, o qual não resultará em produção aumentada de ácido graxo insaturado em *E. coli* (Zhang *et al.*, *J. Biol. Chem.* 277:15558 (2002)). Deleções semelhantes podem ser feitas em outros hospedeiros de produção. Aumento adicional em ácidos graxos insaturados pode ser alcançado, por exemplo, por superexpressão de *fabM* (*trans*-2, *cis*-3-decenoil-ACP isomerase, Acesso no GenBank DAA05501) e expressão controlada de *fabK* (*trans*-2-enoil-ACP redutase II, Acesso no GenBank NP_357969) a partir de *Streptococcus pneumoniae* (Marrakchi *et al.*, *J. Biol. Chem.* 277: 44809, 2002), enquanto deletando *fabI* (*trans*-2-enoil-ACP redutase de *E. coli*, Acesso no GenBank NP_415804). Adicionalmente, para aumentar a percentagem de ésteres graxos insaturados, o hospedeiro de

produção pode também superexpressar *fabB* (codificante de β -cetoacil-ACP sintase I, Acessos: BAA16180, EC:2.3.1.41), *sfa* (codificante de um supressor de *fabA*, Acesso: AAC44390), e *gnsA* e *gnsB* (ambos codificantes de supressores mutantes nulos de *secG*, (ou seja, proteínas de choque a frio), Acesso:ABD18647.1, AAC74076.1). Em alguns exemplos, o gene endógeno *fabF* pode ser atenuado, aumentando, assim, a percentagem de palmitoleato (C_{16:1}) produzido.

C. Comprimento de Cadeia e Características de Éster

1. Comprimento de Cadeia e Produção de Cadeias de Número Ímpar

[0245] Os métodos aqui descritos permitem a produção de ésteres graxos e de derivados de ácido graxo de comprimentos variados. O comprimento de cadeia é controlado por tioésterase, a qual é produzida por expressão das famílias de genes *tes* e *fat*. Pela expressão específica de tioésterases, podem ser produzidos ácidos graxos e derivados de ácido graxo tendo um desejado comprimento de cadeia de carbono. Exemplos não-limitativos de tioésterases apropriadas incluem *TesA* [No. de Acesso no GenBank POADA1], *TesA* sem a sequência líder [No. de Acesso GenBank AAC73596, NP_415027, ou POADA1], *FatB1* [No. de Acesso no GenBank Q41635], *FatB2* [No. de Acesso no GenBank AAC49269], *FatB3* [No. de Acesso no GenBank AAC72881], *FatB* [No. de Acesso no GenBank Q39473, ou CAA85388], *FatA1* [No. de Acesso no GenBank AAL79361], *AtFatA* [No. de Acesso no GenBank NP_189147, NP_193041], *FatA* [No. de Acesso no GenBank CAC 39106 ou AAC72883] e outros descritos, por exemplo, no Pedido de Patente Internacional PCT/US08/058788 (por exemplo, Figura 1), o qual é aqui

incorporado a título de referência. Um gene codificante de uma tioésterase particular pode ser introduzido no hospedeiro de produção de modo que seja produzido o ácido graxo ou derivado de ácido graxo de um comprimento de cadeia de carbono particular. A expressão de tioésterases endógenas deve então ser suprimida.

[0246] Em uma concretização, o derivado de ácido graxo contém uma cadeia de carbono desde cerca de 4 até cerca de 36 átomos de carbono, desde cerca de 6 até cerca de 32 átomos de carbono, desde cerca de 10 até cerca de 30 átomos de carbono, desde cerca de 10 até cerca de 18 átomos de carbono, desde cerca de 24 até cerca de 32 átomos de carbono, desde cerca de 26 até cerca de 30 átomos de carbono, desde cerca de 26 até cerca de 32 átomos de carbono, desde cerca de 5 até cerca de 10 átomos de carbono, desde cerca de 10 até cerca de 16 átomos de carbono, ou desde cerca de 12 até cerca de 18 átomos de carbono. Em uma concretização alternativa, o derivado de ácido graxo contém uma cadeia de carbono de menos que cerca de 20 átomos de carbono, de menos que cerca de 18 átomos de carbono, ou de menos que cerca de 16 átomos de carbono. Em outra concretização, o produto éster graxo é um éster graxo saturado ou insaturado tendo um conteúdo de átomos de carbono entre 24 e 46 átomos de carbono. Em uma concretização, o produto éster graxo tem um conteúdo de átomos de carbono entre 24 e 32 átomos de carbono. Em outra concretização, o produto éster graxo é um éster graxo saturado ou insaturado tendo um conteúdo de átomos de carbono entre 14 e 20 átomos de carbono. Em outra concretização, o éster graxo é o éster metílico de C_{18:1}. Em outra concretização, o éster graxo é o éster etílico de C_{16:1}. Em

outra concretização, o éster graxo é o éster metílico de C_{16:1}.

[0247] Alguns micro-organismos preferencialmente produzem ácidos graxos e derivados de ácido graxo de número par ou ímpar de carbonos. Por exemplo, *E. coli* normalmente produz ácidos graxos e ésteres etílicos de ácido graxo de cadeia de número par de carbonos (FAEE). Surpreendentemente, os métodos aqui descritos podem ser usados para alterar aquela produção. Por exemplo, *E. coli* pode ser feita para produzir ácidos graxos e FAEE de cadeia de número ímpar de carbonos.

2. Características de Éster

[0248] Um éster inclui o que é designado de um lado "A" e um lado "B". O lado A é a cadeia de carbono ligada ao oxigênio do carboxilado do éster. O lado B é a cadeia de carbono compreendendo o carboxilado parental do éster. O lado B pode ser contribuído por um ácido graxo produzido a partir de síntese *de novo* no hospedeiro de produção. Em algumas concretizações, quando o hospedeiro de produção é adicionalmente modificado para produzir alcoóis (incluindo alcoóis graxos), o lado A é também produzido pelo hospedeiro de produção. Ainda em outra concretização, o lado A pode ser provido de modo exógeno, por exemplo, no meio de cultura. Pela seleção dos genes desejados de tioésterase, o lado B (e o lado A quando alcoóis graxos estão sendo produzidos) pode ser desenhado para ter certas características de cadeia de carbono. Essas características incluem pontos de ramificação, insaturação e comprimentos de cadeia de carbono desejados.

[0249] Quando são selecionados genes particulares de tioésterase, o lado A e o lado B terão semelhantes características de cadeia de carbono quando ambos forem contribuídos pelo hospedeiro de produção usando intermediários de rota biossintética de ácido graxo. Por exemplo, pelo menos cerca de 50%, 60%, 70%, ou 80% dos ésteres graxos terão lados A e lados B que variam em comprimento por cerca de 2, 4, 6, 8, 10, 12, ou 14 de carbonos. O lado A e o lado B podem também apresentar semelhantes níveis de ramificação e de saturação.

[0250] Em adição à produção de alcoóis graxos para contribuição ao lado A, o hospedeiro de produção pode produzir outros alcoóis de cadeia curta tais como etanol, propanol, isopropanol, isobutanol, e butanol pela incorporação no lado A usando técnicas bem conhecidas do estado da arte. Por exemplo, butanol pode ser produzido pelo hospedeiro de produção. Para criar células produtoras de butanol, a cepa LS9001, por exemplo, pode ser posteriormente modificada para expressar *atoB* (acetil-CoA acetiltransferase) oriunda de *E. coli* K12, β -hidroxibutiril-CoA desidrogenase oriunda de *Butyrivibrio fibrisolvens*, crotonase oriunda de *Clostridium beijerinckii*, butiril CoA desidrogenase oriunda de *Clostridium beijerinckii*, aldeído desidrogenase CoA-acilante (ALDH) oriunda de *Cladosporium fulvum*, e *adhE* codificante de uma aldeído-álcool desidrogenase de *Clostridium acetobutylicum* no vetor de expressão pBAD24 sob o sistema de promotor *prpBCDE*. Outros hospedeiros de produção podem ser semelhantemente modificados para produzir butanol ou outros alcoóis de cadeia curta. Por exemplo, etanol pode ser produzido no hospedeiro

de produção usando os métodos ensinados por Kalscheuer et al., *Microbiology* 152:2529-2536 (2006), o qual é aqui incorporado a título de referência.

III. Engenharia Genética de Cepa de Produção para Aumentar a Produção de Derivado de Ácido Graxo

[0251] Sequências heterólogas de DNA envolvidas em uma rota biossintética para a produção de derivados de ácido graxo podem ser introduzidas estavelmente ou transientemente no hospedeiro de produção usando técnicas bem conhecidas do estado da arte (exemplos não-limitativos incluem eletroporação, precipitação com fosfato de cálcio, transfecção mediada por DEAE-dextrana, transfecção mediada por lipossomo, conjugação, transdução e integração genômica). Para a transformação estável, uma sequência de DNA pode adicionalmente incluir um marcador de seleção, incluindo exemplos não-limitativos tais como resistência a antibiótico e genes que complementam deficiências auxotróficas.

[0252] Várias concretizações desta descrição podem utilizar um vetor de expressão que inclui uma sequência heteróloga de DNA codificante de uma proteína envolvida na rota metabólica e biossintética. Vetores de expressão apropriados incluem, mas não estão limitados a, vetores virais (tais como vetores de baculovirus), vetores de fago (tal como vetores de bacteriófago), plasmídeos, fagomídeos, cosmídeos, fosmídeos, cromossomos artificiais bacterianos, vetores virais (por exemplo, vetores virais baseados em vírus vaccinia, poliovírus, adenovírus, vírus adeno-associado, SV40, vírus de herpes simplex e semelhantes), cromossomos

artificiais baseados em P1, plasmídeos de levedura, cromossomos artificiais de levedura e outros quaisquer vetores para hospedeiros de produção específicos de interesse (tais como células de *E. coli*, *Pseudomonas piscum* e *Saccharomyces cerevisiae*).

[0253] Vetores de expressão utilizáveis podem incluir um ou mais genes de marcador selecionável para fornecer o caractere fenotípico para a seleção de hospedeiros de produção transformados. O gene de marcador selecionável codifica uma proteína necessária para a sobrevivência ou crescimento de hospedeiros de produção transformados crescidos em um meio de cultura seletivo. Os hospedeiros de produção não transformados com o vetor contendo o gene de marcador selecionável não sobreviverão no meio de cultura. Genes de seleção típicos codificantes de proteínas que (a) conferem resistência a antibióticos ou outras toxinas (por exemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato ou tetraciclina); (b) complementam deficiências auxotróficas; ou (c) fornecem nutrientes críticos não disponíveis a partir de meio complexo (por exemplo, o gene codificante de D-alanina racemato para *Bacilli*). Em concretizações alternativas, o gene marcador selecionável é aquele que codifica diidrofolato redutase ou confere resistência a neomicina (para uso em cultura de células encarióticas), ou aquele que confere resistência a tetraciclina ou ampicilina (para uso em um hospedeiro de produção procariótico, tal como uma célula de *E. coli*).

[0254] No vetor de expressão, a sequência de DNA codificante do gene na rota biossintética está operacionalmente ligada a uma sequência de controle de

expressão apropriada (promotores, *enhancers*, etc.), para dirigir a síntese do produto de gene codificado. Tais promotores podem ser derivados de fontes microbianas ou virais, incluindo CMV e SV40. Dependendo do sistema de hospedeiro de produção/vetor utilizado, qualquer número de elementos de controle de transcrição e de tradução apropriados pode ser usado no vetor de expressão, incluindo promotores constitutivos e induzíveis, elementos enhancer de transcrição, terminadores de transcrição, etc. (ver, por exemplo, Bitter *et al.*, *Methods in Enzymology*, 153:516-544 (1987)).

[0255] Promotores apropriados para uso em hospedeiros de produção procarióticos incluem, mas não estão limitados a, promotores capazes de reconhecer as polimerases T4, T3, Sp6 e T7, os promotores de bacteriófago lambda P_R e P_L, os promotores de *Trp*, *recA*, choque ao calor, e promotores *lacZ* de *E. coli*, os promotores alfa-amilase e o sigma-específico de *B. subtilis*, os promotores dos bacteriófagos de *Bacillus*, *Streptomyces*, o promotor *int* do bacteriófago lambda, o promotor *bla* do gene de beta-lactamase de pBR322, e o promotor CAT do gene de cloramfenicol acetil transferase. Promotores procarióticos adicionais estão descritos em Glick, *J. Ind. Microbiol.* 1:277 (1987); Watson *et al.*, *MOLECULAR BIOLOGY OF THE GENE*, 4th Ed. (1987), Benjamin Cummins (1987); e Sambrook *et al.*, *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*, 2nd Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)). Exemplos não-limitativos de promotores eucarióticos para uso dentro de um hospedeiro de produção eucariótico são virais na origem e incluem o promotor do gene de metalotioneína I de camundongo (Hamer *et al.*, *J. Mol. Appl. Gen.* 1:273

(1982)); o promotor TK do vírus de herpes (McKnight, *Cell* 31:355 (1982)); o promotor preliminar de SV40 (Benoist et al., *Nature* 290:304 (1981)); o promotor de citomegalovírus (Foecking et al., *Gene* 45:101 (1980)); o promotor do gene *gal4* de levedura (Johnston et al., *PNAS (USA)* 79:6971 (1982); Silver et al., *PNAS* 81:5951 (1984)); e o promotor de IgG (Orlandi et al., *PNAS (USA)* 86:3833 (1989)).

[0256] O hospedeiro de produção pode ser geneticamente modificado com uma sequência heteróloga de DNA codificante de um produto de gene da rota biossintética que está operacionalmente ligada a um promotor induzível. Promotores induzíveis são bem conhecidos no estado da técnica. Exemplos não-limitativos de promotores induzíveis apropriados incluem promotores que são afetados por proteínas, metabólitos ou produtos químicos. Esses incluem, mas não estão limitados a: um promotor de vírus de leucemia bovina, um promotor de metalotioneína, um promotor de MMTV dexametasona-induzível, um promotor de SV40, um promotor *polIII* de MRP, um promotor de CMV tetraciclina-induzível (tal como o promotor *human immediate-early* CMV) assim como aqueles oriundos dos *operons* *Trp* e *lac*.

[0257] Em alguns exemplos, o hospedeiro de produção é geneticamente modificado com uma sequência heteróloga de DNA codificante de um produto de gene da rota biossintética que está operacionalmente ligada a um promotor constitutivo. Promotores constitutivos apropriados são conhecidos no estado da técnica e incluem o promotor constitutivo majoritário tardio de adenovírus, um promotor constitutivo de MPSV ou um promotor constitutivo de CMV.

[0258] Em alguns exemplos, um hospedeiro de produção modificado é aquele que é geneticamente modificado com uma sequência exógena de DNA codificante de uma proteína simples envolvida em uma rota de biossíntese. Em outras concretizações, um hospedeiro de produção modificado é aquele que é geneticamente modificado com sequências exógenas de DNA codificantes de duas ou mais proteínas envolvidas em uma rota de biossíntese, por exemplo, a primeira e a segunda enzimas em uma rota biossintética.

[0259] Quando o hospedeiro de produção é geneticamente modificado para expressar duas ou mais proteínas envolvidas em uma rota biossintética, aquelas sequências de DNA podem, cada uma, estar contidas em um único vetor de expressão ou em vetores de expressão separados. Quando aquelas sequências de DNA estão contidas em um único vetor de expressão, em algumas concretizações, as sequências de nucleotídeos estarão operacionalmente ligadas a um elemento de controle comum que controla a expressão de todas as sequências de DNA codificantes de proteína da rota biossintética em um único vetor de expressão (por exemplo, um promotor).

[0260] Quando um hospedeiro de produção modificado é geneticamente modificado com sequências heterólogas de DNA codificantes de duas ou mais proteínas envolvidas em uma rota biossintética, uma das sequências de DNA pode ser operacionalmente ligada a um promotor induzível, e uma ou mais sequências de DNA podem ser operacionalmente ligadas a um promotor constitutivo.

[0261] Em algumas concretizações, a concentração intracelular (por exemplo, a concentração do intermediário no hospedeiro de produção geneticamente modificado) do

intermediário da rota biossintética pode ser aumentada para adicionalmente impulsionar o rendimento do produto final. A concentração intracelular do intermediário pode ser aumentada de várias formas, incluindo, mas não limitado a, aumento da concentração no meio de cultura de um substrato para uma rota biossintética; aumento da atividade catalítica de uma enzima que é ativa na rota biossintética; aumento da quantidade intracelular de um substrato (por exemplo, um substrato primário) ou uma enzima que é ativa na rota biossintética; e semelhantes.

[0262] Em alguns exemplos, o derivado de ácido graxo ou intermediário é produzido no citoplasma do hospedeiro de produção. A concentração citoplasmática pode ser aumentada de inúmeras formas, incluindo, mas não limitadas ao aumento da quantidade de fluxo de carbono através da rota de ácido graxo. Adicionalmente, a concentração de acil-CoA pode ser aumentada pelo aumento da biossíntese de CoA na célula, tal como por superexpressão de genes associados com a biossíntese de pantotenato (por exemplo, *panD*) ou desligamento dos genes associados com a biossíntese de glutatona (por exemplo, glutatona sintase).

[0263] Sequências de regulação, sequências codificantes e combinações das mesmas podem ser introduzidas ou alteradas no cromossomo do hospedeiro de produção. Em alguns exemplos, a integração da sequência recombinante desejada na sequência genômica do hospedeiro de produção não requer o uso de um marcador selecionável, tal como de antibiótico. Em alguns exemplos, as alterações genômicas incluem a mudança da sequência de controle dos genes alvo pela substituição do(s) promotor(es) por um promotor que é insensível à regulação.

Há inúmeras abordagens para fazer isto. Por exemplo, Valle e Flores, *Methods Mol. Biol.* 267:113-122, 2006, descreve um método baseado em PCR para superexpressar genes cromossômicos em *E. coli*. Outra abordagem é baseada no uso de oligonucleotídeos de fita simples para criar mutações específicas diretamente no cromossomo, usando a tecnologia desenvolvida por Court et al., *Proc. Nat. Acad. Sci.* 100:15748-15753, 2003. Esta tecnologia é baseada no uso da superexpressão da proteína Beta oriunda do bacteriófago lambda para melhorar a recombinação genética. As vantagens desta abordagem são que oligonucleotídeos sintéticos de 70 bases de extensão (ou mais) podem ser usados para criar mutações pontuais, inserções e deleções, eliminando, assim, quaisquer etapas de clonagem. Além disso, o sistema é suficientemente eficiente de modo que não são necessários marcadores para isolar as mutações desejadas.

[0264] Com esta abordagem, a região de regulação de um gene pode ser mudada para criar um promotor mais forte e/ou para eliminar o sítio de ligação de um repressor. Dessa maneira, um gene desejado pode ser superexpressado no hospedeiro de produção.

IV. Fermentação

A. Maximizando a Eficiência de Produção

[0265] A produção e o isolamento de derivados de ácido graxo podem ser melhorados pelo emprego de técnicas de fermentação específicas. Um método para maximizar a produção enquanto se reduz os custos é aumentar a percentagem de fonte de carbono que é convertida em produtos de hidrocarboneto.

[0266] Durante os ciclos de vida celular normal, o carbono é usado nas funções celulares incluindo a produção de lipídios, sacarídeos, proteínas, ácidos orgânicos e ácidos nucleicos. A redução da quantidade de carbono necessária para as atividades relacionadas ao crescimento pode aumentar a eficiência da conversão da fonte de carbono em resultado. Isto pode ser alcançado por primeiramente crescer micro-organismos até uma densidade desejada, tal como uma densidade alcançada no pico da fase log de crescimento. Em tal ponto, os genes de barreira de replicação podem ser utilizados para parar o crescimento de células. Especificamente, os mecanismos sensores de quorum (revisto em Camilli *et al.*, *Science* 311:1113 (2006); Venturi, *FEMS Microbio. Rev.* 30:274-291 (2006); e Reading *et al.*, *FEMS Microbiol. Lett.* 254:1-11 (2006), cujas referências são aqui incorporadas a título de referência) podem ser usados para ativar genes tais como *p53*, *p21*, ou outros genes de barreira.

[0267] Genes que podem ser ativados para parar a replicação de células e crescimento em *E. coli* incluem genes *umuDC*, cuja superexpressão interrompe a progressão da fase estacionária para o crescimento exponencial (Murli *et al.*, *J. of Bact.* 182:1127 (2000)). A UmuC é uma DNA polimerase que pode executar a síntese de translesão sobre as lesões não-codificantes - a base mecanística da maioria da mutagênese é por UV e química. Os produtos de gene *umuDC* são usados para o processo de síntese translesão e também servem como uma barreira ao dano de sequência de DNA. Os produtos de gene *umuDC* incluem UmuC, UmuD, *umuD'*, *UmuD'*₂C, *UmuD'*₂ e *UmuD*₂. Simultaneamente, os genes produtores de produto podem ser ativados, minimizando, assim, a

necessidade de rotas de replicação e de manutenção a serem usadas enquanto o derivado de ácido graxo está sendo produzido. Os hospedeiros de produção podem também ser modificados para expressar *umuC* e *umuD* a partir de *E. coli* em pBAD24 sob o sistema de promotor *prpBCDE* através da síntese novamente deste gene com os apropriados genes de produção do produto final.

[0268] A percentagem de carbonos de entrada convertidos para ésteres graxos ou produtos de hidrocarboneto é um dirigente de custo. Quanto mais eficiente for o processo (ou seja, quanto maior a percentagem de carbonos de entrada convertidos em ésteres graxos ou produtos de hidrocarboneto), menor será o custo do processo. Para fontes de carbono contendo oxigênio (por exemplo, glicose e outras fontes baseadas em carboidrato), o oxigênio precisa ser liberado na forma de dióxido de carbono. Para cada 2 átomos de oxigênio liberados, um átomo de carbono também é liberado levando a uma eficiência metabólica teórica máxima de ~34% (p/p) (para produtos derivados de ácido graxo). Este número, entretanto, varia para outros produtos de hidrocarboneto e fontes de carbono. Eficiências típicas da literatura são de aproximadamente <5%. Hospedeiros de produção modificados para produzir produtos de hidrocarboneto podem ter eficiência maior que 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25, e 30%. Em um exemplo, os hospedeiros de produção apresentarão uma eficiência desde cerca de 10% até cerca de 25%. Em outros exemplos, tais hospedeiros de produção apresentarão uma eficiência desde cerca de 25% até cerca de 30%. Em outros exemplos, tais hospedeiros de produção apresentarão eficiência >30%.

[0269] O hospedeiro de produção pode ser adicionalmente modificado para expressar celulosossomos recombinantes, tais como aqueles descritos no número de publicação PCT WO/2008/100251, aqui incorporado a título de referência na sua integralidade, os quais podem permitir que o hospedeiro de produção utilize material celulósico como uma fonte de carbono. Por exemplo, o hospedeiro de produção pode ser adicionalmente modificado para expressar invertases (EC 3.2.1.26) de modo que sacarose possa ser usada como fonte de carbono.

[0270] Semelhantemente, o hospedeiro de produção pode ser modificado usando os ensinamentos descritos nas patentes US 5.000.000; US 5.028.539; US 5.424.202; US 5.482.846; e US 5.602.030 para Ingram *et al.*, todas aqui incorporadas a título de referência na sua integralidade, de modo que o hospedeiro de produção possa assimilar carbono eficientemente e usar materiais celulósicos como fontes de carbono.

[0271] Em um exemplo, a câmara de fermentação encerrará uma fermentação que é submetida a uma redução contínua. Nesta circunstância, deve ser criado um ambiente redutivo estável. O equilíbrio de elétrons deve ser mantido pela liberação de dióxido de carbono (em forma gasosa). Esforços para aumentar o equilíbrio NAD/H e NADP/H também podem facilitar a estabilização do equilíbrio de elétrons. A disponibilidade de NADPH intracelular também pode ser melhorada pela modificação do hospedeiro de produção para expressar uma NADH:NADPH transidrogenase. A expressão de uma ou mais NADH:NADPH transidrogenase converte o NADH produzido na

glicólise para NADPH, o qual melhora a produção de derivados de ácido graxo.

B. Uso de Glicose

[0272] Em algumas circunstâncias, os métodos aqui descritos são realizados usando glicose como fonte de carbono. Em certas circunstâncias, os micro-organismos são crescidos em um meio de cultura contendo uma concentração inicial de glicose desde cerca de 2 g/L até cerca de 50 g/L, tal como cerca desde 5 g/L até cerca de 20 g/L. Em algumas circunstâncias, a concentração de glicose do meio de cultura diminui desde uma concentração inicial de glicose à medida que os micro-organismos consomem a glicose, e uma concentração desde cerca de 0 g/L até cerca de 5 g/L de glicose é mantida no meio de cultura durante o processo de produção do éster de ácido graxo. Em certas circunstâncias, a glicose é alimentada aos micro-organismos em uma solução desde cerca de 50% até cerca de 65% de glicose.

[0273] Em algumas circunstâncias, a taxa de alimentação de glicose é fixada para se igualar com a taxa de crescimento de células para evitar excesso de acumulação de glicose (ou seja, >0% de glicose) no fermentador. Em outras circunstâncias, é mantida uma baixa concentração de excesso de glicose (por exemplo, desde cerca de 2 g/L até cerca de 5 g/L).

[0274] Em certas circunstâncias, os ésteres de ácido graxo podem ser produzidos a partir de outros carboidratos diferentes de glicose, incluindo, mas não limitado a frutose, sacarose hidrolizada, melaços hidrolisados e glicerol.

C. Produção de FAEE com ou sem Álcool Exógeno

[0275] Em algumas circunstâncias, os métodos aqui revelados de produção de éster de ácido graxo são realizados em fermentadores, por exemplo, como descrito aqui. Por exemplo, uma cultura de células é crescida durante a noite, e uma alíquota da cultura é usada para inocular um meio de cultura apropriado contendo desde cerca de 5 g/L até cerca de 50 g/L de glicose em um fermentador com controle de temperatura, pH, agitação, aeração e oxigênio dissolvido. É preferida uma concentração inicial de glicose desde cerca de 5 g/L até cerca de 20 g/L. Condições apropriadas podem incluir, por exemplo, uma temperatura desde cerca de 30°C até cerca de 35°C, um pH desde cerca de 6,6 até cerca de 7,0, e uma concentração de oxigênio dissolvido (DO) desde cerca de 10% até cerca de 50% de saturação. O pH pode ser mantido pela adição de ácidos ou bases apropriados, por exemplo, NH_4OH . Em circunstâncias particulares, as células são mantidas em condições aeróbias.

[0276] Em algumas circunstâncias, desde cerca de 0 g/L até cerca de 5 g/L de glicose é mantida no fermentador durante o processo de produção de éster de ácido graxo. Sem ficar limitado a qualquer teoria, acredita-se que este processo limita a formação de acetato enquanto permite a produção de etanol. Em certas circunstâncias, é usada na corrente de alimentação uma solução de glicose desde cerca de 50% até cerca de 65% de glicose.

[0277] Em alguns métodos, o álcool exógeno é adicionado ao fermentador. Em tais circunstâncias, a taxa de alimentação de glicose é fixada para se igualar à taxa de crescimento das células para evitar excesso de acumulação de glicose (ou seja, >0% de glicose) no fermentador. Em outros métodos, não

é alimentado álcool exógeno e é mantida uma baixa concentração de excesso de glicose (por exemplo, desde cerca de 2 g/L até cerca de 5 g/L).

[0278] Muitos processos de fermentação industrial e farmacêutica usando *E. coli* são processos de batelada alimentada onde a taxa de alimentação de glicose inicial responde a um padrão exponencial que sustenta uma desejada taxa de crescimento, seguida por uma fase de produção na qual a taxa de alimentação de glicose é mantida constante. Durante a fase de crescimento, é comum usar taxas de alimentação de glicose que correspondem às taxas de crescimento entre cerca de $0,1 \text{ h}^{-1}$ e cerca de $0,4 \text{ h}^{-1}$. Taxas de alimentação de glicose mais rápidas também podem ser usadas se for suprido um meio complexo. A taxa de alimentação de glicose durante a fase de produção depende de fatores tais como densidade de células, taxa de captação de glicose e suprimento de oxigênio. Em alguns dos métodos aqui descritos, são usadas taxas de alimentação de glicose desde cerca de 4 g/L/h até cerca de 15 g/L/h, tal como taxas de alimentação de glicose entre cerca de 8 g/L/h e cerca de 12 g/L/h.

[0279] Qualquer meio apropriado para sustentar o crescimento de *E. coli* pode ser usado nos métodos aqui descritos. Exemplos não-limitativos de meios apropriados são descritos em *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., ed. por Sambrook, Fritsch e Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989), o qual é aqui incorporado a título de referência na sua integralidade. Os meios e as concentrações de alimentação de nutrientes tais como açúcar, nitrogênio, fósforo, magnésio, enxofre e potássio

determinarão a densidade máxima de células obtida na fermentação. Não são requeridos micronutrientes tais como elementos traço e vitaminas para o crescimento de *E. coli*, mas são usualmente permitidos para crescimento mais rápido e podem ser requeridos para melhorar a eficiência da rota de produção. Este também é o caso quando fontes complexas de nutriente são adicionadas. Exemplos não-limitativos de tais fontes incluem extrato de levedura, hidrolisados de proteína (de leite, soja, algodão e outras fontes), peptonas, e licor de embeбimento de milho. No presente processo de fermentação, a adição de aminoácidos melhora tanto o crescimento inicial quanto as taxas de produção.

[0280] Em certos métodos, durante as fases iniciais de crescimento celular, a produção de ésteres pode ser induzida pela adição de isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) 1 mM. Quando álcool exógeno é alimentado, o álcool é adicionado no momento da indução (ou seja, quando IPTG é adicionado) a uma concentração de 20 mL/L. Quando álcool exógeno é suprido, o álcool é adicionado diversas vezes durante a corrida para manter uma concentração desde cerca de 10 mL/L até cerca de 30 mL/L.

EXEMPLOS

[0281] Os exemplos que se seguem ilustram a modificação de hospedeiros de produção para produzir ésteres de ácidos graxos, tal como FAEE. A rota biossintética envolvida na produção de derivados de ácido graxo, tal como FAEE, é ilustrada nas figuras.

[0282] Por exemplo, a Figura 1 é um diagrama da rota FAS mostrando as enzimas diretamente envolvidas na síntese

de acil-ACP. Para aumentar a produção de derivados de ácido graxo, tais como parafinas, ésteres graxos, alcoóis graxos e hidrocarbonetos, uma ou mais das enzimas presentes na Figura 1 podem ser superexpressadas ou mutadas para reduzir a retro-inibição para aumentar a quantidade de acil-ACP produzido. Adicionalmente, as enzimas que metabolizam os intermediários para produzir produtos baseados em ácidos não-graxos (reações secundárias) podem ser funcionalmente deletadas ou atenuadas para aumentar o fluxo de carbono através da rota biossintética de ácido graxo. Nos exemplos abaixo, muitos hospedeiros de produção são descritos, os quais foram modificados para aumentar a produção de ácido graxo.

[0283] A Figura 3, Figura 4 e Figura 5 mostram rotas biossintéticas que podem ser modificadas para produzir alcoóis graxos e ésteres graxos, respectivamente. Como ilustrado na Figura 4, a conversão de cada substrato (por exemplo, acetil-CoA, malonil-CoA, acil-ACP, ácido graxo e acil-CoA) para cada produto (por exemplo, acetil-CoA, malonil-CoA, acetil-ACP, ácido graxo e acil-CoA) pode ser realizada usando diversos polipeptídeos diferentes que são membros das classes de enzima indicadas.

[0284] Os exemplos abaixo descrevem métodos de produção de FAEE por fermentação de micro-organismos com ou sem álcool exógeno.

Métodos

[0285] Os métodos a seguir foram usados nos Exemplos descritos abaixo.

Concentração de Glicose

[0286] A concentração de glicose ao longo da fermentação foi analisada por Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC). A análise de HPLC foi realizada de acordo com as seguintes condições: HPLC Agilent Série 1200 com detetor de Índice de Refração; Coluna: Aminex HPX-87H, 300 mm × 7,8 mm; temperatura de coluna: 35°C; fase móvel: H₂SO₄ 0,01 M (aquosa); taxa de fluxo: 0,6 mL/min; volume de injeção: 20 µL.

Concentração de Éster de Ácido Graxo

[0287] A produção de ésteres metílicos de ácido graxo (aqui referidos como "FAME") e de FAEE foi analisada por cromatografia de gás com detector de ionização de chama (GC-FID). As amostras de mosto de fermentação foram extraídas com acetato de etila em uma razão de 1:1 v/v. Após forte vortex, as amostras foram centrifugadas e a fase orgânica foi analisada por cromatografia gasosa (GC). As condições de análise foram as seguintes: instrumento: *Trace GC Ultra*, *Thermo Electron Corporation* com detector (FID) de detector de ionização de Chama; coluna: DB-1 (difênil siloxana a 1%; dimetil siloxane a 99%) CO1 UFM 1/0,1/5 01 DET oriunda de Thermo Electron Corporation, pH de fase 5, FT: 0,4 µm, comprimento 5 m, id: 0,1 mm; condições de entrada: 250°C tipo sem divisão de fluxo, 3,8 min 1/25 método tipo com divisão de fluxo usado dependendo da concentração da amostra com fluxo dividido de 75 mL/min; gás carreador, taxa de fluxo: Hélio, 3,0 mL/min; temperatura de bloqueio: 330°C; temperatura de forno: 0,5 de minuto mantido a 50°C; 100°C/minuto até 330°C; 0,5 de minuto mantido a 330°C; temperatura de detector: 300°C; volume de injeção: 2 µL;

tempo de corrida/taxa de fluxo: 6,3 min/3,0 mL/min (método sem divisão de fluxo), 3,8 min/1,5 mL/min (método com divisão de fluxo 1/25), 3,04 min/1,2 mL/min (método com divisão de fluxo 1/50).

Condições de Fermentação

[0288] As fermentações foram realizadas em fermentadores de 2 L. Células oriundas de um estoque congelado foram crescidas em um meio definido de: 1,5 g/L de KH_2PO_4 , 4,54 g/L de K_2HPO_4 triidratado, 4 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,15 g/L de MgSO_4 heptaidratado, 20 g/L de glicose, 200 mM de tampão Bis-Tris (pH 7,2), 1,25 mL/L de minerais traço e 1,25 mL/L de uma solução de vitaminas. A solução de minerais traço foi composta de 27 g/L de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2 g/L de $\text{ZnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 2 g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2 g/L de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,9 g/L de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g/L de H_3BO_3 , e 100 mL/L de HCl concentrado. A solução de vitaminas era composta de 0,42 g/L de riboflavina, 5,4 g/L de ácido pantotênico, 6 g/L de niacina, 1,4 g/L de piridoxina, 0,06 g/L de biotina, e 0,04 g/L de ácido fólico.

[0289] Após as células, oriundas do estoque congelado terem sido cultivadas durante a noite, 50 mL da cultura foram usados para inocular 1 L do mesmo meio descrito acima, mas com somente 5 g/L de glicose, em um fermentador com controle de temperatura, pH, agitação, aeração e oxigênio dissolvido. As condições para a fermentação foram 32°C, pH 6,8 e oxigênio dissolvido (DO) igual a 30% de saturação. O pH foi mantido por adição de NH_4OH , o qual também atua como uma fonte de nitrogênio para o crescimento das células. Quando os iniciais 5 g/L de glicose estavam quase consumidos (por exemplo, menos

do que cerca de 0,5 g/L glicose), uma alimentação consistindo em 60% de glicose, 3,9 g/L de MgSO₄ heptaidratado e 10 mL/L da solução de traços de minerais foi suprida ao fermentador.

[0290] Quando álcool exógeno foi suprido, a taxa de alimentação foi fixada para se igualar à taxa de crescimento das células para evitar acumulação de glicose no fermentador. Quando álcool exógeno não foi suprido, foi mantida uma baixa concentração de excesso de glicose (por exemplo, desde cerca de 2 g/L até cerca de 5 g/L).

[0291] Nas fases iniciais do crescimento, a produção de ésteres foi induzida pela adição de isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) 1 mM. Quando álcool exógeno foi suprido, o álcool foi adicionado no momento da indução (ou seja, quando IPTG foi adicionado) em uma concentração de 20 mL/L. A fermentação continuou por 3 dias. Quando álcool exógeno foi suprido, o álcool foi adicionado diversas vezes durante a corrida para manter uma concentração desde cerca de 10 mL/L até cerca de 30 mL/L.

Exemplo 1 - Produção de FAEE Sem Etanol Exógeno, Alimentações Múltiplas de Metanol

[0292] Foram primeiramente construídos *E. coli* modificada, cepa Δ4 (MG1655 Δ*fadE* Δ*fabR* Δ*poxB* Δ*ldhA*) portando um plasmídeo contendo *tesA*, *fadD* e *atfA1*.

1. Construção da Cepa Δ4

[0293] O gene *fadE* de *E. coli* MG1655 (uma cepa K de *E. coli*) foi deletado usando o sistema Lambda Red (também conhecido como a Integração Red-Dirigida), descrito em

Datsenko *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 6640-6645 (2000), com as modificações a seguir.

[0294] Foram usados dois *primers* para criar a deleção:

Del-*fadE*-F

5'-AAAAACAGCAACAATGTGAGCTTTGTTGTAATTATATTGTAAAC
ATATTGATTCCGGGGATCCGTCGACC (SEQ ID NO:1)

Del-*fadE*-R

5'-AAACGGAGCCTTTCGGCTCCGTTATTCATTTACGCGGCTTCAAC
TTTCCTGTAGGCTGGAGCTGCTTC (SEQ ID NO:2)

[0295] Os primers Del-*fadE*-F e Del-*fadE*-R foram usados para amplificar o cassete de resistência a Canamicina (Km^R) a partir do plasmídeo pKD13 (como descrito em Datsenko *et al.*, acima citado) por PCR. O produto de PCR foi então usado para transformar células eletrocompetentes de *E. coli* MG1655 contendo o pKD46 (descrito em Datsenko *et al.*, acima citado). Essas células haviam sido previamente induzidas com arabinose por 3-4 h. Em seguida a um crescimento por 3 h em um mosto super ótimo com meio de repressão de catabólito (SOC) a 37°C, as células foram plaqueadas em placas com Luria agar contendo 50 µg/mL de canamicina. As colônias resistentes foram identificadas e isoladas após uma incubação durante a noite a 37°C. A ruptura do gene *fadE* foi confirmada em colônias seletas usando amplificação por PCR com os primers *fadE*-L2 e *fadE*-R1, os quais foram desenhados para flanquear o gene *fadE*:

fadE-L2 5'-CGGGCAGGTGCTATGACCAGGAC (SEQ ID NO:3)

fadE-R1 5'-CGCGGCGTTGACCGGCAGCCTGG (SEQ ID NO:4)

[0296] Após isso, a deleção do *fadE* foi confirmada, uma única colônia foi usada para remover o marcador Km^R, usando o plasmídeo pCP20 como descrito em Datsenko *et al.*, acima mencionado. A resultante cepa MG1655 de *E. coli* com o gene *fadE* deletado e o marcador Km^R removido foi denominada de *E. coli* MG1655 Δ *fadE*, ou *E. coli* MG1655 D1.

[0297] O gene *fabR* de *E. coli*, o qual codifica um regulador de biossíntese de ácido graxo, e que também foi relatado como um repressor de *E. coli* *fabA*, *fabB* e *yqfA* (ver, por exemplo, McCue *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 29(3):774-82 (2001); Zhang *et al.*, *J. Biol. Chem.* 277(18):15558-65 (2002)), foi deletado de *E. coli* MG1655 D1 usando o sistema Lambda Red descrito em Datsenko *et al.*, acima mencionado, mas com as modificações a seguir.

[0298] Dois *primers* foram usados para criar a deleção:

Del-*fabR*-F: 5'-

ATGTTTTATTGCGTTACCGTTCATTCACAATACTGGAGCAATCCAG

TATGCATATGAATATCCTCCTTAGTTCC-3' (SEQ ID NO:5)

Del-*fabR*-R: 5'-

CGTACCTCTATCTTGATTTGCTTGTTTCATTACTCGTCCTTCACA

TTTCCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG - 3' (SEQ ID NO:6)

[0299] Os *primers* Del-*fabR*-F e Del-*fabR*-R foram usados para amplificar o cassete Km^R a partir do plasmídeo pKD13 por PCR. O produto de PCR obtido foi usado para transformar células eletrocompetentes de *E. coli* MG1655 D1 contendo o pKD46 (ver acima). Essas células haviam sido previamente induzidas com arabinose por 3-4 h. Em seguida a um crescimento por 3 h em meio SOC a 37°C, as células foram plaqueadas em placas com Luria agar contendo 50 µg/mL de

canamicina. As colônias resistentes a canamicina foram identificadas e isoladas após uma incubação durante a noite a 37°C. A ruptura do gene *fabR* foi confirmada em colônias seletas por amplificação por PCR com os *primers fabR-verF* e *fabR-verR*, os quais foram desenhados para flanquear o gene *fabR*.

fabR-verF: 5'-AACCGGCCAAAGAATTGCAG-3' (SEQ ID NO:7)

fabR-verR: 5'- TAAGCCAGCAACTAACGCCA-3' (SEQ ID NO:8)

[0300] Após ter sido confirmada a deleção do *fabR*, uma única colônia foi usada para remover o marcador Km^R, usando o plasmídeo pCP20 como descrito em Datsenko *et al.*, acima mencionado. A resultante cepa MG1655 de *E. coli*, tendo as deleções de gene *fadE* e *fabR*, foi dado o nome de $\Delta 2$ e usada para posteriores deleções de gene.

[0301] O gene *poxB* de *E. coli*, o qual codifica uma piruvato oxidase (ver, por exemplo, Chang *et al.*, *J. Bacteriol.* 154(2):756-62 (1983); Abdel-Ahmid *et al.*, *Microbiol.* 147(6):1483-98 (2001)) foi deletado a partir da cepa *E. coli* MG1655 $\Delta 2$ usando o sistema Lambda Red descrito em Datsenko *et al.*, acima citado, mas com as modificações a seguir.

[0302] Dois *primers* foram usados para criar a deleção:

Del-*poxB*-F: 5'-GATGAACTAAACTTGTTACCGTTATCACATTCAGGAGATGGAGA
ACCATGCATATGAATATCCTCCTTAGTTCC-3' (SEQ ID NO:9)

Del-*poxB*-R: 5' -

CCTTATTATGACGGGAAATGCCACCCTTTTTACCTTAGCCAGTTTG

TTTTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG - 3' (SEQ ID NO:10)

[0303] Os *primers* Del-*poxB*-F e Del-*poxB*-R foram usados para amplificar o cassete Km^R a partir do plasmídeo pKD13 por PCR. O produto de PCR obtido foi usado para transformar as células eletrocompetentes obtidas *E. coli* MG1655 Δ2 contendo o pKD46 (ver acima). Essas células haviam sido previamente induzidas com arabinose por 3-4 h. Em seguida a um crescimento por 3 h em meio SOC a 37°C, as células foram plaqueadas em placas com Luria agar contendo 50 µg/mL de canamicina. As colônias resistentes a canamicina foram identificadas e isoladas após uma incubação durante a noite a 37°C. A ruptura do gene *poxB* foi confirmada em colônias seletas por amplificação por PCR com os *primers* *poxB*-verF e *poxB*-verR, os quais foram desenhados para flanquear o gene *poxB*.

poxB-verF: 5'- CGGGCTATTTAACCGTTAGT-3' (SEQ ID NO:11)

poxB-verR: 5'- AGAGCATTAACGGTAGGG-3' (SEQ ID NO:12)

[0304] Após ter sido confirmada a deleção de *poxB*, uma única colônia foi usada para remover o marcador Km^R, usando o plasmídeo pCP20 como descrito em Datsenko *et al.*, acima citado. À cepa resultante MG1655 *E. coli* foi dado o nome de Δ3 e foi usada para posteriores deleções de gene.

[0305] O gene *ldhA* de *E. coli*, que codifica lactato desidrogenases, especificamente uma D-lactato desidrogenase fermentativa NAD-ligada (ver, por exemplo, Mat-Jan *et al.*, *J. Bacteriol.* 171(1):342-8 (1989); Bunch *et al.*, *Microbiol.* 143(1):187-95 (1997)) foi então deletado da cepa Δ3 de *E. coli*, usando o sistema Lambda Red descrito em Datsenko *et al.*, acima citado, mas com as seguintes modificações.

[0306] Dois *primers* foram usados para criar a deleção:

Del-*ldhA*-F: 5'-

TATTTTGTAGTAGCTTAAATGTGATTCAACATCACTGGAGAAAGTCTTA

TGCATATGAATATCCTCCTTAGTTCC-3' (SEQ ID NO:13)

Del-*ldhA*-R: 5'

CTCCCCTGGAATGCAGGGGAGCGGCAAGATTAAACCAGTTCGTTTCG

GGCAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG - 3' (SEQ ID NO:14)

[0307] A ruptura do gene *ldhA* foi confirmada em colônias seletas por amplificação por PCR com os *primers* *ldhA-verF* e *ldhA-verR*, os quais foram desenhados para flanquear o gene *ldhA*.

ldhA-verF: 5'- CAATATCGCCATAGCTTTC-3' (SEQ ID NO:15)

ldhA-verR: 5'- TACAGTTTCTGACTCAGG-3' (SEQ ID NO:16)

[0308] Após ter sido confirmada a deleção do *ldhA*, uma única colônia foi usada para remover o marcador Km^R, usando o plasmídeo pCP20 como descrito em Datsenko *et al.*, acima citado. À cepa resultante MG1655 *E. coli* tendo as deleções de gene *fadE*, *fabR*, *poxB*, e *ldhA* foi dado o nome de Δ4.

2. Criação dos plasmídeos *tesA*, *fadD* e *atfA1*

[0309] *E. coli* '*tesA* é uma sequência de nucleotídeos compreendendo uma *E. coli tesA leaderless* (No. de Acesso no GenBank AAC73596, refseq de Acesso U00096.2). A '*tesA* codifica uma tioésterase de *E. coli* (EC 3.1.1.5, 3.1.2.-) na qual os primeiros vinte e cinco aminoácidos foram deletados e o aminoácido na posição 26, alanina, foi substituído por metionina. Essa metionina então se tornou o primeiro aminoácido de '*tesA* (ver Cho *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 270:4216-4219 (1995). O *E. coli fadD* (No. de Acesso no GenBank AAC74875; REFSEQ: acesso U00096.2) codifica uma

acil-CoA sintase. O *atfA1* (entrada no GenBank YP_694462; REFSEQ: acesso NC_008260.1) da cepa SK2 de *Alcanivorax borkumensis* codifica uma éster sintase.

a) Construção do Plasmídeo 'tesA

[0310] O 'tesA foi amplificado a partir de um plasmídeo pETDuet-1-'tesA construído como descrito abaixo (ver, por exemplo, WO 2007/136762 A2, o qual é aqui incorporado a título de referência). O gene 'tesA foi clonado em um plasmídeo pETDuet-1 digerido com *NdeI*/*AvrII* (Novagen, Madison, WI).

b) Construção do Plasmídeo *fadD*

[0311] O *fadD* foi amplificado a partir de um plasmídeo pHZ1.61 construído como descrito abaixo. Um gene *fadD* foi clonado em um plasmídeo pCDFDuet-1 (Novagen, Madison, WI) sob o controle de um promotor T7, gerando um plasmídeo pHZ1.61 contendo a seguinte sequência de nucleotídeos:

```
GGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTGTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAATAA
GGAGATATAACCATGGTGAAGAAGGTTTGGCTTAACCGTTATCCCGCGGACGTTCCGACG
GAGATCAACCCTGACCGTTATCAATCTCTGGTAGATATGTTTGAGCAGTCGGTCGCGCG
CTACGCCGATCAACCTGCGTTTGTGAATATGGGGGAGGTAATGACCTTCCGCAAGCTGG
AAGAACGCAGTCGCGCGTTTGGCGCTTATTTGCAACAAGGGTTGGGGCTGAAGAAAGGC
GATCGCGTTGCGTTGATGATGCCTAATTTATTGCAATATCCGGTGGCGCTGTTTGGCAT
TTTGCGTGCCGGGATGATCGTCGTAAACGTTAACCCGTTGTATACCCGCGTGAGCTTG
AGCATCAGCTTAACGATAGCGGCGCATCGGCGATTGTTATCGTGTCTAACTTTGCTCAC
ACACTGGAAAAAGTGGTTGATAAAACCGCCGTTTCAGCACGTAATTCTGACCCGTATGGG
CGATCAGCTATCTACGGCAAAAGGCACGGTAGTCAATTTTCGTTGTAAATACATCAAGC
GTTTGGTGCCGAAATACCATCTGCCAGATGCCATTTTCATTTTCGTAGCGCACTGCATAAC
GGCTACCGGATGCAGTACGTCAAACCCGAAGTGGTGCCGGAAGATTTAGCTTTTCTGCA
```

ATACACCGGCGGCACCACTGGTGTGGCGAAAGGCGCGATGCTGACTCACCGCAATATGC
TGGCGAACCTGGAACAGGTTAACGCGACCTATGGTCCGCTGTTGCATCCGGGCAAAGAG
CTGGTGGTGACGGCGCTGCCGCTGTATCACATTTTTGCCCTGACCATTAAGTGCCTGCT
GTTTATCGAACTGGGTGGGCAGAACCTGCTTATCACTAACCCGCGCGATATTCCAGGGT
TGGTAAAAGAGTTAGCGAAATATCCGTTTACCGCTATCACGGGCGTTAACACCTTGTTT
AATGCGTTGCTGAACAATAAAGAGTTCCAGCAGCTGGATTTCTCCAGTCTGCATCTTTC
CGCAGGCGGAGGGATGCCAGTGCAGCAAGTGGTGGCAGAGCGTTGGGTGAACTGACAG
GACAGTATCTGCTGGAAGGCTATGGCCTTACCGAGTGTGCGCCGCTGGTCAGCGTTAAC
CCATATGATATTGATTATCATAGTGGTAGCATCGGTTTGCCGGTGCCGTCGACGGAAGC
CAAAGTGGTGGATGATGATGATAATGAAGTACCACCGGGTCAACCGGGTGAGCTTTGTG
TCAAAGGACCGCAGGTGATGCTGGGTTACTGGCAGCGTCCGGATGCTACAGATGAGATC
ATCAAAAATGGCTGGTTACACACCGGCGACATCGCGGTGATGGATGAAGAAGGGTTCCCT
GCGCATTGTGATCGTAAAAAAGACATGATTCTGGTTTCCGGTTTTAACGTCTATCCCA
ACGAGATTGAAGATGTCGTCATGCAGCATCCTGGCGTACAGGAAGTCGCGGCTGTTGGC
GTACCTTCCGGCTCCAGTGGTGAAGCGGTGAAAATCTTCGTAGTGAAAAAAGATCCATC
GCTTACCGAAGAGTCACTGGTGACCTTTTGCCGCGTCAGCTCACGGGCTACAAAGTAC
CGAAGCTGGTGGAGTTTCGTGATGAGTTACCGAAATCTAACGTCGGAAAAATTTTGCGA
CGAGAATTACGTGACGAAGCGCGCGGCAAAGTGGACAATAAAGCCTGAAAGCTTGCGGC
CGCATAATGCTTAAGTCGAACAGAAAGTAATCGTATTGTACACGGCCGCATAATCGAAA
TTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCATCTTAGTATAT
TAGTTAAGTATAAGAAGGAGATATACATATGCGCCATTACATCCGATTGATTTTATAT
TCCTGTCACTAGAAAAAAGACAACAGCCTATGCATGTAGGTGGTTTATTTTTGTTTCAG
ATTCCTGATAACGCCCCAGACACCTTTATTCAAGATCTGGTGAATGATATCCGGATATC
AAAATCAATCCCTGTTCCACCATTCAACAATAAACTGAATGGGCTTTTTTGGGATGAAG
ATGAAGAGTTTGATTTAGATCATCATTTTCGTCATATTGCACTGCCTCATCCTGGTCGT
ATTCGTGAATTGCTTATTTATATTTTCAAGAGCACAGTACGCTGCTAGATCGGGCAA
GCCCTTGTGGACCTGCAATATTATTGAAGGAATTGAAGGCAATCGTTTTGCCATGTACT
TCAAAATTCACCATGCGATGGTCGATGGCGTTGCTGGTATGCGGTTAATTGAAAAATCA
CTCTCCCATGATGTAACAGAAAAAAGTATCGTGCCACCTTGGTGTGTTGAGGGAAAACG
TGCAAAGCGCTTAAGAGAACCTAAAACAGGTAAAATTAAGAAAATCATGTCTGGTATTA

AGAGTCAGCTTCAGGCGACACCCACAGTCATTCAAGAGCTTTCTCAGACAGTATTTAAA
GATATTGGACGTAATCCTGATCATGTTTCAAGCTTTCAGGCGCCTTGTTCTATTTTGAA
TCAGCGTGTGAGCTCATCGCGACGTTTTGCAGCACAGTCTTTTGACCTAGATCGTTTTC
GTAATATTGCCAAATCGTTGAATGTGACCATTAATGATGTTGTACTAGCGGTATGTTCT
GGTGCATTACGTGCGTATTTGATGAGTCATAATAGTTTGCCTTCAAACCATTAATTGC
CATGGTTCCAGCCTCTATTTCGAATGACGATTGAGATGTCAGCAACCGTATTACGATGA
TTCTGGCAAATTTGGCAACCCACAAAGATGATCCTTTACAACGTCTTGAAATTATCCGC
CGTAGTGTTCAAACTCAAAGCAACGCTTCAAACGTATGACCAGCGATCAGATTCTAAA
TTATAGTGCTGTGCTATATGGCCCTGCAGGACTCAACATAATTTCTGGCATGATGCCAA
AACGCCAAGCCTTCAATCTGGTTATTTCCAATGTGCCTGGCCCAAGAGAGCCACTTTAC
TGGAATGGTGCCAACTTGATGCACTCTACCCAGCTTCAATTGTATTAGACGGTCAAGC
ATTGAATATTACAATGACCAGTTATTTAGATAAACTTGAAGTTGGTTTGATTGCATGCC
GTAATGCATTGCCAAGAATGCAGAATTTACTGACACATTTAGAAGAAGAAATTCAACTA
TTTGAAGGCGTAATTGCAAAGCAGGAAGATATTAAAACAGCCAATTAAAAACAATAAAC
TTGATTTTTTAATTTATCAGATAAACTAAAGGGCTAAATTAGCCCTCCTAGGCTGCTG
CCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGT
TTTTTGCTGAAACCTCAGGCATTTGAGAAGCACACGGTCACACTGCTTCCGGTAGTCAA
TAAACCGGTAAACCAGCAATAGACATAAGCGGCTATTTAACGACCCTGCCCTGAACCGA
CGACCGGGTCATCGTGGCCGGATCTTGCGGCCCTCGGCTTGAACGAATTGTTAGACAT
TATTTGCCGACTACCTTGGTGATCTCGCCTTTCACGTAGTGGACAAATTCTTCCAAGTG
ATCTGCGCGCGAGGCCAAGCGATCTTCTTCTGTCCAAGATAAGCCTGTCTAGCTTCAA
GTATGACGGGCTGATACTGGGCCGGCAGGCGCTCCATTGCCCAGTCGGCAGCGACATCC
TTCGGCGCGATTTTGCCGGTTACTGCGCTGTACCAAATGCGGGACAACGTAAGCACTAC
ATTTGCTCATCGCCAGCCCAGTCGGGCGGCGAGTTCCATAGCGTTAAGGTTTCATTTA
GCGCCTCAAATAGATCCTGTTTCAAGAACCGGATCAAAGAGTTCCCTCCGCCGCTGGACCT
ACCAAGGCAACGCTATGTTCTCTTGCTTTTGTGAGCAAGATAGCCAGATCAATGTGAT
CGTGGCTGGCTCGAAGATACCTGCAAGAATGTCATTGCGCTGCCATTCTCCAAATTGCA
GTTGCGCTTAGCTGGATAACGCCACGGAATGATGTCGTCGTGCACAACAATGGTGACT
TCTACAGCGCGGAGAATCTCGCTCTCTCCAGGGGAAGCCGAAGTTTCCAAAAGGTGCTT
GATCAAAGCTCGCCGCGTTGTTTCATCAAGCCTTACGGTCACCGTAACCAGCAAATCAA

TATCACTGTGTGGCTTCAGGCCGCCATCCACTGCGGAGCCGTACAAATGTACGGCCAGC
AACGTCGGTTCGAGATGGCGCTCGATGACGCCAACTACCTCTGATAGTTGAGTCGATAC
TTCGGCGATCACCGCTTCCCTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATC
AGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATA
GCTAGCTCACTCGGTGCTACGCTCCGGGCGTGAGACTGCGGCGGGCGCTGCGGACACA
TACAAAGTTACCCACAGATTCCGTGGATAAGCAGGGGACTAACATGTGAGGCAAAACAG
CAGGGCCGCGCCGGTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCTCCTGCCAGAGTTCACATAA
ACAGACGCTTTTCCGGTGATCTGTGGGAGCCGTGAGGCTCAACCATGAATCTGACAGT
ACGGGCGAAACCCGACAGGACTTAAAGATCCCCACCGTTTCCGGCGGGTCGCTCCCTCT
TGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGTTTACCGGATACCTGTTCCGCCTTTCTCCCTTA
CGGGAAGTGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACACACTGGTATCTCGGCTCGGTGTAGGTCTG
TTCGCTCCAAGCTGGGCTGTAAGCAAGAACTCCCCGTTTACGCCCGACTGCTGCGCCTTA
TCCGGTAACTGTTCACTTGAGTCCAACCCGAAAAGCACGGTAAAACGCCACTGGCAGC
AGCCATTGGTAACTGGGAGTTCGCAGAGGATTTGTTTAGCTAAACACGCGGTTGCTCTT
GAAGTGTGCGCCAAAGTCCGGCTACACTGGAAGGACAGATTTGGTTGCTGTGCTCTGCG
AAAGCCAGTTACCACGGTTAAGCAGTTCCCCAACTGACTTAACCTTCGATCAAACCACC
TCCCCAGGTGGTTTTTTTCGTTTACAGGGCAAAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTC
AAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACTGAACCGCTCTAGATTTTCAAGTGAATTTATCTCT
TCAAATGTAGCACCTGAAGTCAGCCCCATACGATATAAGTTGTAATTCTCATGTTAGTC
ATGCCCCGCGCCACCGGAAGGAGCTGACTGGGTGTAAGGCTCTCAAGGGCATCGGTCTG
AGATCCCGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTTACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCC
CTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGG
AGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCCAGGGTGGTTTTTCTTTTACCAGTGAGACGGGCA
ACAGCTGATTGCCCTTACCGCCTGGCCCTGAGAGAGTTGCAGCAAGCGGTCCACGCTG
GTTTGCCCCAGCAGGCGAAAATCCTGTTTGATGGTGGTTAACGGCGGGATATAACATGA
GCTGTCTTCGGTATCGTCGTATCCCACTACCGAGATGTCCGCACCAACGCGCAGCCCGG
ACTCGGTAATGGCGCGCATTGCGCCCAGCGCCATCTGATCGTTGGCAACCAGCATCGCA
GTGGGAACGATGCCCTCATTACGATTTGCGATGGTTTGTTGAAAACCGGACATGGCACT
CCAGTCGCCTTCCCGTTCCGCTATCGGCTGAATTTGATTGCGAGTGAGATATTTATGCC
AGCCAGCCAGACGCAGACGCGCCGAGACAGAACTTAATGGGCCCGCTAACAGCGCGATT

TGCTGGTGACCCAATGCGACCAGATGCTCCACGCCCAGTCGCGTACCGTCTTCATGGGA
 GAAAATAATACTGTTGATGGGTGTCTGGTCAGAGACATCAAGAAATAACGCCGGAACAT
 TAGTGCAGGCAGCTTCCACAGCAATGGCATCCTGGTCATCCAGCGGATAGTTAATGATC
 AGCCCACTGACGCGTTGCGCGAGAAGATTGTGCACCGCCGCTTTACAGGCTTCGACGCC
 GCTTCGTTCTACCATCGACACCACCACGCTGGCACCCAGTTGATCGGCGCGAGATTTAA
 TCGCCGCGACAATTTGCGACGGCGCGTGCAGGGCCAGACTGGAGGTGGCAACGCCAATC
 AGCAACGACTGTTTGCCCGCCAGTTGTTGTGCCACGCGGTTGGGAATGTAATTCAGCTC
 CGCCATCGCCGCTTCCACTTTTTCCCGCGTTTTTCGCAGAAACGTGGCTGGCCTGGTTCA
 CCACGCGGGAAACGGTCTGATAAGAGACACCGGCATACTCTGCGACATCGTATAACGTT
 ACTGGTTTCACATTCACCACCCTGAATTGACTCTCTTCCGGGCGCTATCATGCCATACC
 GCGAAAGGTTTTGCGCCATTCGATGGTGTCCGGGATCTCGACGCTCTCCCTTATGCGAC
 TCCTGCATTAGGAAATTAATACGACTCACTATA (SEQ ID NO:17)

a) Construção do Plasmídeo *atfA1*

[0312] O *atfA1* foi amplificado a partir de um plasmídeo pHZ1.97-*atfA1* construído como descrito abaixo. O gene *atfA1* foi sintetizado por meio de DNA2.0 (Menlo Park, CA) e clonado em um plasmídeo pCOLA-Duet-1 digerido com *NdeI* e *AvrII* (Novagen, Madison, WI), gerando um plasmídeo pHZ1.97-*atfA1* tendo a seguinte seqüência de nucleotídeos:

GGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTGTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAATAA
 GGAGATATAACCATGGGCAGCAGCCATCACCATCATCACCACAGCCAGGATCCGAATTCCG
 AGCTCGGCGCGCCTGCAGGTGACAAGCTTGCGGCCGCATAATGCTTAAGTCGAACAGA
 AAGTAATCGTATTGTACACGGCCGCATAATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAA
 TTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTTAGTATATTAGTTAAGTATAAGAAGGAGATAT
 ACATATGAAAGCGCTTAGCCCAGTGGATCAACTGTTCCCTGTGGCTGGAAAAACGACAGC
 AACCCATGCACGTAGGCGGTTTGCAGCTGTTTTCTTCCCGGAAGGTGCCGGCCCCAAG
 TATGTGAGTGAGCTGGCCCAGCAAATGCGGGATTACTGCCACCCAGTGGCGCCATTCAA
 CCAGCGCCTGACCCGTCGACTCGGCCAGTATTACTGGACTAGAGACAAACAGTTCGATA
 TCGACCACCACTTCCGCCACGAAGCACTCCCCAAACCCGGTCGCATTTCGCGAACTGCTT

TCTTTGGTCTCCGCCGAACATTCCAACCTGCTGGACCGGGAGCGCCCCATGTGGGAAGC
CCATTTGATCGAAGGGATCCGCGGTGCGCAGTTCGCTCTCTATTATAAGATCCACCATT
CGGTGATGGATGGCATATCCGCCATGCGTATCGCCTCCAAAACGCTTTCCACTGACCCC
AGTGAACGTGAAATGGCTCCGGCTTGGGCGTTCAACACCAAAAAACGCTCCCGCTCACT
GCCCAGCAACCCGGTTGACATGGCCTCCAGCATGGCGCGCCTAACCGCGAGCATAAGCA
AACAAAGCTGCCACAGTGCCCGGTCTCGCGCGGGAGGTTTACAAAGTCACCCAAAAAGCC
AAAAAAGATGAAAACCTATGTGTCTATTTTTTCAGGCTCCCGACACGATTCTGAATAATAC
CATCACCGGTTACGCCGCTTTGCCGCCAGAGCTTTCCATTACCGCGCCTGAAAGTTA
TCGCCAAGGCCTATAACTGCACCATTAAACACCGTGGTGCTCTCCATGTGTGGCCACGCT
CTGCGCGAATACTTGATTAGCCAACACGCGCTGCCCGATGAGCCACTGATTGCAATGGT
GCCCATGAGCCTGCGGCAGGACGACAGCACTGGCGGCAACCAGATCGGTATGATCTTGG
CTAACCTGGGCACCCACATCTGTGATCCAGCTAATCGCCTGCGCGTCATCCACGATTCC
GTCGAGGAAGCCAAATCCCGCTTCTCGCAGATGAGCCCGGAAGAAATTCTCAATTTAC
CGCCCTCACTATGGCTCCACCGGCTTGAACCTTACTGACCGGCCTAGCGCCAAAATGGC
GGGCCTTCAACGTGGTGATTTCCAACATACCCGGGCGAAAGAGCCGCTGTACTGGAAT
GGTGACAGCTGCAAGGAGTGTATCCAGTATCCATTGCCTTGGATCGCATCGCCCTAAA
TATCACCTCACCAGTTATGTAGACCAGATGGAATTTGGGCTTATCGCCTGCCGCCGTA
CTCTGCCTTCCATGCAGCGACTACTGGATTACCTGGAACAGTCCATCCGCGAATTGGAA
ATCGGTGCAGGAATTAAATAGTAACCTAGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCA
TAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTTGCTGAAACCTCAGGCATT
TGAGAAGCACACGGTCACACTGCTTCCGGTAGTCAATAAACCGGTAAACCAGCAATAGA
CATAAGCGGCTATTTAACGACCCTGCCCTGAACCGACGACAAGCTGACGACCGGGTCTC
CGCAAGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTTATTTTTCTAAA
TACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAATTAATTCTTAGAAAACTCATCGAGCATCAA
ATGAAACTGCAATTTATTCATATCAGGATTATCAATACCATATTTTTTGAAAAAGCCGTT
TCTGTAATGAAGGAGAAAACTCACCGAGGCAGTTCATAGGATGGCAAGATCCTGGTAT
CGGTCTGCGATTCCGACTCGTCCAACATCAATACAACCTATTAATTTCCCCTCGTCAAA
AATAAGGTTATCAAGTGAGAAATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGAATGGCA
AAAGTTTATGCATTTCTTTCCAGACTTGTTCAACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCATCA
AAATCACTCGCATCAACCAAACCGTTATTCATTTCGTGATTGCGCCTGAGCGAGACGAAA

TACGCGGTCTGCTGTTAAAAGGACAATTACAAACAGGAATCGAATGCAACCGGCGCAGGA
ACACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTCACCTGAATCAGGATATTCTTCTAATACCTGG
AATGCTGTTTTCCCGGGGATCGCAGTGGTGAGTAACCATGCATCATCAGGAGTACGGAT
AAAATGCTTGATGGTCGGAAGAGGCATAAATTCGTCAGCCAGTTTAGTCTGACCATCT
CATCTGTAACATCATTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTCAGAAACAACCTCTGGCGCA
TCGGGCTTCCCATAACAATCGATAGATTGTGCGACCTGATTGCCCCGACATTATCGCGAGC
CCATTTATACCCATATAAATCAGCATCCATGTTGGAATTTAATCGCGGCCTAGAGCAAG
ACGTTTCCCGTTGAATATGGCTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTAT
CAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAAT
AGGCATGCTAGCGCAGAAACGTCCTAGAAGATGCCAGGAGGATACTTAGCAGAGAGACA
ATAAGGCCGGAGCGAAGCCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAACATCACGAA
ATCTGACGCTCAAATCAGTGGTGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTT
TCCCCCTGATGGCTCCCTCTTGCGCTCTCCTGTTCCCGTCCTGCGGCGTCCGTGTTGTG
GTGGAGGCTTTACCCAAATCACCACGTCCCGTTCCGTGTAGACAGTTCGCTCCAAGCTG
GGCTGTGTGCAAGAACCCCCGTTTCAGCCCGACTGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCA
TCTTGAGTCCAACCCGAAAGACACGACAAAACGCCACTGGCAGCAGCCATTGGTAACT
GAGAATTAGTGGATTTAGATATCGAGAGTCTTGAAGTGGTGGCCTAACAGAGGCTACAC
TGAAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCCACTAAAGCCAGTTACCAGGTTAAGCAGTT
CCCCAACTGACTTAACCTTCGATCAAACCGCCTCCCCAGGCGGTTTTTTTCGTTTACAGA
GCAGGAGATTACGACGATCGTAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTACGGATTCCCGACA
CCATCACTCTAGATTTTCAGTGCAATTTATCTCTTCAAATGTAGCACCTGAAGTCAGCCC
CATACGATATAAGTTGTAATTCTCATGTAGTCATGCCCCGCGCCCACCGGAAGGAGCT
GACTGGGTTGAAGGCTCTCAAGGGCATCGGTTCGAGATCCCGGTGCCTAATGAGTGAGCT
AACTTACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGC
CAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCCA
GGGTGGTTTTTTCTTTTCACCAGTGAGACGGGCAACAGCTGATTGCCCTTCACCGCCTGG
CCCTGAGAGAGTTGCAGCAAGCGGTCCACGCTGGTTTGCCCCAGCAGGCGAAAATCCTG
TTTGATGGTGGTTAACGGCGGGATATAACATGAGCTGTCTTCGGTATCGTCGTATCCCA
CTACCGAGATGTCCGCACCAACGCGCAGCCCGGACTCGGTAATGGCGCGCATTTGCGCCC
AGCGCCATCTGATCGTTGGCAACCAGCATCGCAGTGGGAACGATGCCCTCATTCAGCAT

TTGCATGGTTTGTGAAAACCGGACATGGCACTCCAGTCGCCTTCCCGTTCCGCTATCG
 GCTGAATTTGATTGCGAGTGAGATATTTATGCCAGCCAGCCAGACGCAGACGCGCCGAG
 ACAGAACTTAATGGGCCCCGCTAACAGCGCGATTGCTGGTGACCCAATGCGACCAGATG
 CTCCACGCCCAGTCGCGTACCGTCTTCATGGGAGAAAATAATACTGTTGATGGGTGTCT
 GGTCAGAGACATCAAGAAATAACGCCGGAACATTAGTGCAGGCAGCTTCCACAGCAATG
 GCATCCTGGTCATCCAGCGGATAGTTAATGATCAGCCCACTGACGCGTTGCGCGAGAAG
 ATTGTGCACCGCCGCTTTACAGGCTTCGACGCCGCTTCGTTCTACCATCGACACCACCA
 CGCTGGCACCCAGTTGATCGGCGCGAGATTTAATCGCCGCGACAATTTGCGACGGCGCG
 TGCAGGGCCAGACTGGAGGTGGCAACGCCAATCAGCAACGACTGTTTGCCCGCCAGTTG
 TTGTGCCACGCGGTTGGGAATGTAATTCAGCTCCGCCATCGCCGCTTCCACTTTTTCCC
 GCGTTTTTCGCAGAAACGTGGCTGGCCTGGTTTACCACGCGGGAAACGGTCTGATAAGAG
 ACACCGGCATACTCTGCGACATCGTATAACGTTACTGGTTTCACATTCACCACCCTGAA
 TTGACTCTCTTCCGGGCGCTATCATGCCATACCGCGAAAGGTTTTGCGCCATTCGATGG
 TGTCCGGGATCTCGACGCTCTCCCTTATGCGACTCCTGCATTAGGAAATTAATACGACT
 CACTATA (SEQ ID NO:18)

3. Criação de um cassette de integração 'tesA, fadD, atfA1

[0313] As sequências de nucleotídeos, '*tesA*, *fadD* e *atfA1*, foram integrados no cromossomo de *E. coli* MG1655 Δ4 no locus *lacZ*. As sequências foram integradas na ordem de '*tesA*, seguida por *fadD*, e seguida por *atfA1*, e colocadas sob o controle de um promotor Trc, como descrito a seguir.

a) Construção do plasmídeo pACYC-PTrc contendo 'tesA, fadD e atfA1

[0314] Um vetor pACYC-PTrc tendo a sequência a seguir foi usada para construir um plasmídeo pACYC-PTrc- '*tesA-fadD-atfA1*. A sequência de nucleotídeos do vetor pACYC-PTrc é como se segue:

ACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGT
GCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGG
ACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATC
GTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCT
GCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTC
CCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCT
CGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCT
CGCGGTATCATTCGAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTA
CACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTG
CCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATT
GATTTAAAACTTCATTTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTTGATAATCT
CATGACCAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCTTAATAA
GATGATCTTCTTGAGATCGTTTTTGGTCTGCGCGTAATCTCTTGCTCTGAAAACGAAAAA
ACCGCCTTGACAGGGCGGTTTTTCGAAGGTCTCTGAGCTACCAACTCTTTGAACCGAGG
TAACTGGCTTGGAGGAGCGCAGTCACCAAACCTTGTCCTTTCAGTTTAGCCTTAACCGG
CGCATGACTTCAAGACTAACTCCTCTAAATCAATTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGTGC
TTTTGCATGTCTTTCCGGGTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGT
CGGACTGAACGGGGGGTTTCGTGCATACAGTCCAGCTTGGAGCGAACTGCCTACCCGGAA
CTGAGTGTCAGGCGTGGAATGAGACAAACGCGGCCATAACAGCGGAATGACACCGGTAA
ACCGAAAGGCAGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCCGCCAGGGGGAAACGCCTGGTAT
CTTTATAGTCCTGTGCGGTTTCGCCACCACTGATTTGAGCGTCAGATTTTCGTGATGCTT
GTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGGCTTTGCCGCGGCCCTCTCACTTCCCTGTT
AAGTATCTTCTGTCATCTTCCAGGAAATCTCCGCCCCGTTCGTAAGCCATTTCCGCTC
GCCGCAGTCGAACGACCGAGCGTAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAATATATCCTG
TATCACATATTCTGCTGACGCACCGGTGCAGCCTTTTTTCTCCTGCCACATGAAGCACT
TCACTGACACCCTCATCAGTGCCAAACATAGTAAGCCAGTATACACTCCGCTAGCGCTGA
GGTCTGCCTCGTGAAGAAGGTGTTGCTGACTCATACCAGGCCTGAATCGCCCCATCATC
CAGCCAGAAAGTGAGGGAGCCACGGTTGATGAGAGCTTTGTTGTAGGTGGACCAGTTGG
TGATTTTGAACTTTTGCTTTGCCACGGAACGGTCTGCGTTGTGCGGAAGATGCGTGATC
TGATCCTTCAACTCAGCAAAAGTTTCGATTTATTCAACAAAGCCACGTTGTGTCTCAAAA

TCTCTGATGTTACATTGCACAAGATAAAAAATATATCATCATGAACAATAAACTGTCTG
CTTACATAAACAGTAATACAAGGGGTGTTATGAGCCATATTCAACGGGAAACGTCTTGC
TCGAGGCCGCGATTAAATTCCAACATGGATGCTGATTTATATGGGTATAAATGGGCTCG
CGATAATGTCGGGCAATCAGGTGCGACAATCTATCGATTGTATGGGAAGCCCGATGCGC
CAGAGTTGTTTCTGAAACATGGCAAAGGTAGCGTTGCCAATGATGTTACAGATGAGATG
GTCAGACTAAACTGGCTGACGGAATTTATGCCTCTTCCGACCATCAAGCATTTTATCCG
TACTCCTGATGATGCATGGTTACTCACCCTGCGATCCCCGGGAAAACAGCATTTCCAGG
TATTAGAAGAATATCCTGATTCAGGTGAAAATATTGTTGATGCGCTGGCAGTGTTCTTG
CGCCGGTTGCATTCGATTCCTGTTTGTAAATGTCCTTTTAACAGCGATCGCGTATTTTCG
TCTCGCTCAGGCGCAATCACGAATGAATAACGGTTTGGTTGATGCGAGTGATTTTGATG
ACGAGCGTAATGGCTGGCCTGTTGAACAAGTCTGGAAAGAAATGCATAAGCTTTTGCCA
TTCTCACCGGATTCAGTCGTCCTCATGGTGATTTCTCACTTGATAACCTTATTTTTGA
CGAGGGGAAATTAATAGGTTGTATTGATGTTGGACGAGTCGGAATCGCAGACCGATACC
AGGATCTTGCCATCCTATGGAAGTGCCTCGGTGAGTTTTCTCCTTCATTACAGAAACGG
CTTTTTCAAAAATATGGTATTGATAATCCTGATATGAATAAATTGCAGTTTCATTTGAT
GCTCGATGAGTTTTTCTAATCAGAATTGGTTAATTGGTTGTAACACTGGCAGAGCATTA
CGCTGACTTGACGGGACGGCGGCTTTGTTGAATAAATCGAACTTTTGCTGAGTTGAAGG
ATCAGATCACGCATCTTCCCGACAACGCAGACCGTTCCGTGGCAAAGCAAAGTTCAAA
ATCACCAACTGGTCCACCTACAACAAAGCTCTCATCAACCGTGGCTCCCTCACTTTCTG
GCTGGATGATGGGGCGATTTCAGGCCTGGTATGAGTCAGCAACACCTTCTTCACGAGGCA
GACCTCAGCGCTCAAAGATGCAGGGGTAAAAGCTAACCGCATCTTTACCGACAAGGCAT
CCGGCAGTTCAACAGATCGGGAAGGGCTGGATTTGCTGAGGATGAAGGTGGAGGAAGGT
GATGTCATTCTGGTGAAGAAGCTCGACCGTCTTGCCGCGACACCGCCGACATGATCCA
ACTGATAAAAGAGTTTGATGCTCAGGGTGTAGCGGTTTCGGTTTATTGACGACGGGATCA
GTACCGACGGTGATATGGGGCAAATGGTGGTCACCATCCTGTGCGCTGTGGCACAGGCT
GAACGCCGGAGGATCCTAGAGCGCACGAATGAGGGCCGACAGGAAGCAAAGCTGAAAGG
AATCAAATTTGGCCGCAGGCGTACCGTGGACAGGAACGTCGTGCTGACGCTTCATCAGA
AGGGCACTGGTGCAACGGAAATTGCTCATCAGCTCAGTATTGCCCGCTCCACGGTTTAT
AAAATTCTTGAAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATG
ATAATAATGGTTTCTTAGACGTCTTAATTAATCAGGAGAGCGTTCACCGACAAACAACA

GATAAAACGAAAGGCCAGTCTTTTCTGACTGAGCCTTTTCGTTTTATTTGATGCCTGGCAG
TTCCCTACTCTCGCATGGGGAGACCCACACTACCATCGGCGCTACGGCGTTTCACTTC
TGAGTTCGGCATGGGGTCAGGTGGGACCACCGCGCTACTGCCGCCAGGCAAATTCTGTT
TTATCAGACCGCTTCTGCGTTCTGATTTAATCTGTATCAGGCTGAAAATCTTCTCTCAT
CCGCCAAAACAGCCAAGCTGGAGACCGTTTAAACTCAATGATGATGATGATGATGGTCG
ACGGCGCTATTACAGATCCTCTTCTGAGATGAGTTTTTGTTCGGGCCCCAAGCTTCGAATT
CCCATATGGTACCAGCTGCAGATCTCGAGCTCGGATCCATGGTTTATTCTCTCTTATTT
AATCGATACATTAATATATACCTCTTTAATTTTTAATAATAAAGTTAATCGATAATTCC
GGTCGAGTGCCACACAGATTGTCTGATAAATTGTTAAAGAGCAGTGCCGCTTCGCTTT
TTCTCAGCGGCGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACATTAT
ACGAGCCGGATGATTAATTGTCAACAGCTCATTTTCTGAGAAATTTTCCAGAACCGTTATG
ATGTCGGCGCAAAAAACATTATCCAGAACGGGAGTGCGCCTTGAGCGACACGAATTATG
CAGTGATTTACGACCTGCACAGCCATACCACAGCTTCCGATGGCTGCCTGACGCCAGAA
GCATTGGTGCACCGTGAGTCGATGATAAGCTGTCAAACCAGATCAATTCGCGCTAACT
CACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGC
TGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCCAGGGT
GGTTTTTCTTTTACCAGTGAGACGGGCAACAGCTGATTGCCCTTACCAGCCTGGCCCT
GAGAGAGTTGCAGCAAGCGGTCCACGCTGGTTTGCCCCAGCAGGCGAAAATCCTGTTTG
ATGGTGGTTGACGGCGGGATATAACATGAGCTGTCTTCGGTATCGTCGTATCCCACTAC
CGAGATATCCGCACCAACGCGCAGCCCGGACTCGGTAATGGCGCGCATTGCGCCCAGCG
CCATCTGATCGTTGGCAACCAGCATCGCAGTGGGAACGATGCCCTCATTACGATTTGCG
ATGGTTTGTTGAAAACCGGACATGGCACTCCAGTCGCCTTCCCGTTCCGCTATCGGCTG
AATTTGATTGCGAGTGAGATATTTATGCCAGCCAGCCAGACGCGAGACGCGCCGAGACAG
AACTTAATGGGCCCCGCTAACAGCGCGATTTGCTGGTGACCCAATGCGACCAGATGCTCC
ACGCCCAGTCGCGTACCGTCTTCATGGGAGAAAATAATACTGTTGATGGGTGTCTGGTC
AGAGACATCAAGAAATAACGCCGGAACATTAGTGCAGGCAGCTTCCACAGCAATGGCAT
CCTGGTCATCCAGCGGATAGTTAATGATCAGCCCACTGACGCGTTGCGCGAGAAGATTG
TGCACCGCCGCTTTACAGGCTTCGACGCGCTTCGTTCTACCATCGACACCACCACGCT
GGCACCAGTTGATCGGCGCGAGATTTAATCGCCGCGACAATTTGCGACGGCGCGTGCA
GGGCCAGACTGGAGGTGGCAACGCCAATCAGCAACGACTGTTTGCCCGCCAGTTGTTGT

GCCACGCGGTTGGGAATGTAATTCAGCTCCGCCATCGCCGCTTCCACTTTTTCCCGCGT
 TTTCGCAGAAACGTGGCTGGCCTGGTTCACCACGCGGGAAACGGTCTGATAAGAGACAC
 CGGCATACTCTGCGACATCGTATAACGTTACTGGTTTCACATTCACCACCCTGAATTGA
 CTCTCTTCCGGGCGCTATCATGCCATAACGCGAAAGGTTTTGCACCATTTCGATGGTGTC
 AACGTAAATGCATGCCGCTTCGCCTTCGCGCGCGAATTGATCTGCTGCCTCGCGCGTTT
 CGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTC
 TGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTTGGCGGG
 GCCGGCCTCG (SEQ ID NO:19)

[0315] Os genes '*tesA*, *fadD* e *atfA1* foram amplificados usando uma polimerase Phusion™ de alta fidelidade (New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA), com os seguintes primers primers oriundos de seus respectivos plasmídeos, pETDuet-1-*'tesA*, pHZ1.61, e pHZ1.97-*atfA1*:

*'tesA*Forward- 5'-
 CTCTAGAAATAATTTAACTTTAAGTAGGAGAUAGGTACCCATGG
 CGGACACGTTATTGAT (SEQ ID NO:20)

*'tesA*Reverse- 5'-CTTCGAATTCCATTTAAATTATTTCTAGAGTCATTATGAGTC
 ATGATTTACTAAAGGC (SEQ ID NO:21)

*fadD*Forward- 5'-CTCTAGAAATAATTTTAGTTAAGTATAAGAAGGAGATATACC
 ATGGTGAAGAAGGTTTGGCTTAA (SEQ ID NO:22)

*fadD*Reverse- 5'-CTTCGAATTCCATTTAAATTATTTCTAGAGTTATCAGGCTTTA
 TTGTCCAC (SEQ ID NO:23)

*atfA1*Forward- 5'-CTCTAGAAATAATTTAGTTAAGTATAAGAAGGAGATATACAT
 (SEQ ID NO:24)

*atfA1*Reverse- 5'-CTTCGAATTCCATTTAAATTATTTCTAGAGTTACTATTTA
 ATTCCTGCACCGATTTC (SEQ ID NO:25)

b) Inserção de '*tesA* no Plasmídeo pACYC-Ptrc

[0316] Usando os sítios *NcoI* e *EcoRI* em ambos inserto e vetor, o produto de PCR '*tesA* amplificado a partir de pETDuet-1-'*tesA* foi clonado na posição inicial do vetor pACYC-PTrc (SEQ ID NO:19). Uma DNA ligase T4 (New England Biolabs, Ipswich, MA) foi então usada para ligar o vetor pACYC-PTrc e '*tesA*, produzindo um plasmídeo pACYC-PTrc-'*tesA*. Em seguida a uma ligação feita durante a noite, o produto de DNA foi transformado em células Top 10 One Shot® (Invitrogen, Carlsbad, CA). A inserção do '*tesA* no vetor pACYC-PTrc foi confirmada por digestão de restrição. Um sítio de restrição *SwaI*, assim como fragmentos de superposição para clonagem In-Fusion™ (Clontech, Mountain View, CA), foi criado na extremidade 3' do inserto '*tesA*.

c) Construção de pACYC-PTrc-'*tesA-fadD-atfA1*

[0317] O plasmídeo pACYC-PTrc-'*tesA* foi então submetido a uma digestão no período durante a noite por meio de *SwaI*. O *fadD* amplificado a partir de pHZ1.61 foi clonado após o gene '*tesA* usando clonagem In-Fusion™. Esta inserção de *fadD* foi verificada com digestão de restrição. A inserção de *fadD* destrói o sítio *SwaI* seguindo o gene '*tesA*, mas recria um novo sítio *SwaI* na extremidade 3' de *fadD*. O plasmídeo pACYC-PTrc-'*tesA-fadD* foi novamente linearizado por meio de *SwaI* e *atfA1* amplificado a partir de pHZ1.97-*atfA1* foi clonado após o gene *fadD* usando clonagem In-Fusion™. A inserção apropriada de *atfA1* foi verificada por digestão de restrição.

d) Construção do plasmídeo pOP-80 (pCL)

[0318] Um plasmídeo de baixo número de cópias pCL1920 (de acordo com Lerner *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 18:4631 (1990)) portando um promotor de transcrição forte foi

digerido com as enzimas de restrição *AflIII* e *SfoI* (New England BioLabs Inc. Ipswich, MA). Os três fragmentos de sequência de DNA foram produzidos por esta digestão, entre os quais um fragmento de 3737 pb foi purificado por gel usando um kit de gel-purificação (Qiagen, Inc. Valencia, CA). Em paralelo, um fragmento contendo o promotor-Trc e a região *lacI* do plasmídeo comercial pTrcHis2 (Invitrogen, Carlsbad, CA) foi amplificado por PCR usando os seguintes *primers*:

LF302: 5'-ATATGACGTCGGCATCCGCTTACAGACA-3' (SEQ ID NO: 26)

LF303 (5'-AATTCTTAAGTCAGGAGAGCGTTCACCGACAA-3' (SEQ ID NO:27)).

[0319] Esses dois *primers* também introduziram sítios de reconhecimento para *ZraI* (gacgtc) e *AflIII* (cttaag), na extremidade do produto de PCR. O produto de PCR foi purificado usando um kit de PCR-purificação (Qiagen, Inc. Valencia, CA) e digerido com *ZraI* e *AflIII* seguindo as recomendações do fabricante (New England BioLabs Inc., Ipswich, MA). O produto de PCR digerido foi purificado por gel e ligado com um fragmento de sequência de DNA de 3737 pb derivado do pCL1920. A mistura de ligação foi transformada em células TOP10® quimicamente competentes (Invitrogen, Carlsbad, CA), e os transformantes foram plaqueados em placas com Luria agar contendo 100 µg/mL de espectinomicina. Após incubação durante a noite a 37°C, inúmeras colônias ficaram visíveis. Um número seletivo dessas colônias foi purificado, analisado com enzimas de restrição e sequenciado. Um dos plasmídeos foi retido e dado o nome de pOP-80.

e) Construção de pCL-TFW-atfA1

[0320] O operon '*tesA-fadD-atfA1* foi removido de pACYC-'*tesA-fadD-atfA1* usando digestão de restrição com *MluI* e *EcoRI* (New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA). Ele é então clonado em sítios complementares no pOP-80 para criar o plasmídeo pCL-TFW-*atfA1*.

f) Integração do operon PTrc-'*tesA-fadD-atfA1* no cromossomo de *E. coli* $\Delta 4$ no locus *lacI-lacZ*

[0321] O plasmídeo pCL-TFW-*atfA1* foi digerido com a enzima de restrição *HindIII* (New England Biolabs, Inc., Ipswich). Em paralelo, foi obtido um cassete do gene de cloramfenicol a partir do plasmídeo pLoxPcat2 (No. de Acesso no GenBank AJ401047) por digestão com as enzimas de restrição *BamHI* e *AvrII* (New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA). Ambos os fragmentos de DNA foram tornados de extremidades cegas (*blunt-ended*) usando o fragmento Klenow de polimerase de DNA. Os fragmentos resutantes foram ligados e transformados para gerar o plasmídeo pCLTFWcat.

[0322] O plasmídeo *placZ*, construído e sintetizado por meio de DNA2.0 (Menlo Park, CA) de acordo com a sequência da SEQ ID NO:28 (abaixo) foi usado como um molde (*template*) para amplificação por PCR.

CTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCAGGCAGTTCAACCTGTTGATAGTACGTAC
TAAGCTCTCATGTTTCACGTACTAAGCTCTCATGTTTAACGTACTAAGCTCTCATGTTT
AACGAATAAACCTCATGGCTAACGTACTAAGCTCTCATGGCTAACGTACTAAGCTCT
CATGTTTCACGTACTAAGCTCTCATGTTTGAACAATAAAATTAATATAAATCAGCAACT
TAAATAGCCTCTAAGGTTTTAAGTTTTATAAGAAAAAAGAATATATAAGGCTTTTAA
AGCTTTTAAAGGTTTAAACGGTTGTGGACAACAAGCCAGGGATGTAACGCACTGAGAAGCC
CTTAGAGCCTCTCAAAGCAATTTTCAGTGACACAGGAACACTTAACGGCTGACAGCCTG
AATTCTGCAGATCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGT

TGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCTTTGCCTGGTTTCCGGTACCAGAAGCGGTGCCG
GAAAGCTGGCTGGAGTGCGATCTTCCTGAGGCCGATACTGTCGTCGTCCCCTCAAACCTG
GCAGATGCACGGTTACGATGCGCCCATCTACACCAACGTAACCTATCCCATTACGGTCA
ATCCGCCGTTTGTTCACGGAGAATCCGACGGGTGTTACTCGCTCACATTTAATGTT
GATGAAAGCTGGCTACAGGAAGGCCAGACGCGAATTATTTTTGATGGCGTTAACTCGGC
GTTTCATCTGTGGTGCAACGGGCGCTGGGTTCGGTTACGGCCAGGACAGTCGTTTGCCGT
CTGAATTTGACCTGAGCGCATTTTTACGCGCCGGAGAAAACCGCCTCGCGGTGATGGTG
CTGCGTTGGAGTGACGGCAGTTATCTGGAAGATCAGGATATGTGGCGGATGAGCGGCAT
TTTCCGTGACGTCTCGTTGCTGCATAAACCGACTACACAAATCAGCGATTTCCATGTTG
CCACTCGCTTTAATGATGATTTTCAGCCGCGCTGTACTGGAGGCTGAAGTTCAGATGTGC
GGCGAGTTGCGTGACTACCTACGGGTAACAGTTTCTTTATGGCAGGGTGAAACGCAGGT
CGCCAGCGGCACCGCGCCTTTTCGGCGGTGAAATTATCGATGAGCGTGGTGGTTATGCCG
ATCGCGTCACACTACGTCTGAACGTCGAAAACCCGAAACTGTGGAGCGCCGAAATCCCG
AATCTCTATCGTGCGGTGGTTGAACTGCACACCGCCGACGGCACGCTGATTGAAGCAGA
AGCCTGCGATGTCGGTTTCCGCGAGGTGCGGATTGAAAATGGTCTGCTGCTGCTGAACG
GCAAGCCGTTGCTGATTCGAGGCGTTAACCGTCACGAGCATCATCCTCTGCATGGTCAG
GTCATGGATGAGCAGACGATGGTGCAGGATATCCTGCTGATGAAGCAGAACAACTTTAA
CGCCGTGCGCTGTTTCGATTATCCGAACCATCCGCTGTGGTACACGCTGTGCGACCGCT
ACGGCCTGTATGTGGTGGATGAAGCCAATATTGAAACCCACGGCATGGTGCCAATGAAT
CGTCTGACCGATGATCCGCGCTGGCTACCGGCGATGAGCGAACGCGTAACGCGAATGGT
GCAGCGCGATCGTAATCACCCGAGTGTGATCATCTGGTCGCTGGGGAATGAATCAGGCC
ACGGCGCTAATCACGACGCGCTGTATCGCTGGATCAAATCTGTGATCCTTCCCGCCCCG
GTGCAGTATGAAGGCGGCGGAGCCGACACCACGGCCACCGATATTATTTGCCCGATGTA
CGCGCGCGTGGATGAAGACCAGCCCTTCCCGGCTGTGCCGAAATGGTCCATCAAAAAAT
GGCTTTCGCTACCTGGAGAGACGCGCCCGCTGATCCTTTGCGAATACGCCACGCGATG
GGTAACAGTCTTGGCGGTTTCGCTAAATACTGGCAGGCGTTTCGTCAGTATCCCCGTTT
ACAGGGCGGCTTCGTCTGGGACTGGGTGGATCAGTCGCTGATTAAATATGATGAAAACG
GCAACCCGTGGTCGGCTTACGGCGGTGATTTTGGCGATACGCCGAACGATCGCCAGTTC
TGTATGAACGGTCTGGTCTTTGCCGACCGCACGCCGCATCCAGCGCTGACGGAAGCAAA
ACACCAGCAGCAGTTTTTCCAGTTCCGTTTATCCGGGCAAACCATCGAAGTGACCAGCG

AATACCTGTTCCGTCATAGCGATAACGAGCTCCTGCACTGGATGGTGGCGCTGGATGGT
AAGCCGCTGGCAAGCGGTGAAGTGCCTCTGGATGTCGCTCCACAAGGTAAACAGTTGAT
TGAAGTGCCTGAACTACCGCAGCCGGAGAGCGCCGGGCAACTCTGGCTCACAGTACGCG
TAGTGCAACCGAACGCGACCGCATGGTCAGAAGCCGGGCACATCAGCGCCTGGCAGCAG
TGGCGTCTGGCGGAAAACCTCAGTGTGACGCTCCCCGCCGCTCCACGCCATCCCGCA
TCTGACCACCAGCGAAATGGATTTTTGCATCGAGCTGGGTAATAAGCGTTGGCAATTTA
ACCGCCAGTCAGGCTTTCTTTACAGATGTGGATTGGCGATAAAAAACAACCTGCTGACG
CCGCTGCGCGATCAGTTCACCCGTGCACGTCTGCTGTCAGATAAAGTCTCCCGTGAACCT
TTACCCGGTGGTGCATATCGGGGATGAAAGCTGGCGCATGATGACCACCGATATGGCCA
GTGTGCCGGTCTCCGTTATCGGGGAAGAAGTGGCTGATCTCAGCCACCGCGAAAATGAC
ATCAAAAACGCCATTAACCTGATGTTCTGGGGAATATAAATGTCAGGCATGAGATTATC
AAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTTCAGTAGAAAGCCAGTCCGCAGAAACGGTGCT
GACCCCGGATGAATGTCAGCTACTGGGCTATCTGGACAAGGGAAAACGCAAGCGCAAAG
AGAAAGCAGGTAGCTTGCAGTGGGCTTACATGGCGATAGCTAGACTGGGCGGTTTTATG
GACAGCAAGCGAACCGGAATTGCCAGCTGGGGCGCCCTCTGGTAAGGTTGGGAAGCCCT
GCAAAGTAACTGGATGGCTTTCTCGCCGCCAAGGATCTGATGGCGCAGGGGATCAAGC
TCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGC
AGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAA
TCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTT
GTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAAGACGAGGCAGCGCGGCTATC
GTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCTTGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGG
GAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCTCACCTT
GCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGA
TCCGGCTACCTGCCCATTTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTA
GGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCG
CCAGCCGAACTGTTTCGCCAGGCTCAAGGCGAGCATGCCCCGACGGCGAGGATCTCGTCGT
GACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGAT
TCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACC
CGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGG
TATCGCCGCTCCCGATTTCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCT

GAATTATTAACGCTTACAATTTCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGT
 ATTTACACACCGCATACAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGT
 TTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAAT
 GCTTCAATAATAGCACGTGAGGAGGGCCACCATGGCCAAGTTGACCAGTGCCGTTCCGG
 TGCTCACCGCGCGCGACGTCGCCGGAGCGGTCGAGTTCTGGACCGACCGGCTCGGGTTC
 TCCC (SEQ ID NO:28)

[0323] Os primers de PCR LacZFnotI e pKDRspeI foram desenhados para criar sítios de restrição para a *NotI* e a *SpeI*, respectivamente:

LacZFnotI 5' - CAACCAGCGGCCGCGCAGACGATGGTGCAGGATATC (SEQ ID NO:29)

pKDRspeI 5' - CCACACACTAGTCAGATCTGCAGAATTCAGGCTGTC (SEQ ID NO:30)

[0324] O fragmento de DNA resultante foi ligado com um fragmento de DNA oriundo do plasmídeo pCLTFWcat digerido com as enzimas *SpeI* e *NotI*. A mistura de ligação foi usada como um molde para outra reação de PCR usando os primers *lacIF* e *lacZR* localizados nas regiões *lacI* e *lacZ*.

lacIF 5' - GGCTGGCTGGCATAAATATCTC (SEQ ID NO:31)

lacZR 5' - CATCGCGTGGGCGTATTCG (SEQ ID NO:32)

[0325] O produto de PCR resultante ("Cassete de Integração") contém aproximadamente 500 bases de homologia com relação a *lacI* ou a *lacZ* em cada extremidade. Este produto de PCR foi usado para transformar células de *E. coli* MG1655 Δ4 que foram tornadas hipercompetentes com o plasmídeo pKD46 (ver acima).

4. Produção de éster etílico de ácido graxo pela cepa de produção

[0326] A cepa *E. coli* MG1655 $\Delta 4$ portando o plasmídeo 'tesA, *fadD* e *atfA1* foi crescida em fermentadores sob condições aeróbias favoráveis ao crescimento de produção de FAME. As células foram inicialmente crescidas com excesso de glicose e excesso de oxigênio. Nenhuma acumulação de etanol foi observada. Após a indução, a cultura foi mantida com uma alimentação de glicose mais baixa do que o consumo, de modo que a glicose não se acumulasse. Glicose foi alimentada para manter uma limitação de glicose. A concentração de metanol foi de cerca de 10 g/L imediatamente após a indução (em torno de 20 h) e aumentada para cerca de 15 g/L após 48 h. Uma pequena quantidade de glicose foi acumulada ao final da fermentação. Nas primeiras horas após a indução, FAME representava 71% dos ésteres totais produzidos, enquanto FAEE, com uma concentração de cerca de 2 g/L, representava os outros 29%. Mais tarde, durante a fermentação, quando a concentração de metanol foi aumentada, o FAME foi produzido a uma taxa mais alta e a distribuição mudou para 86% de FAME e 14% de FAEE, com uma concentração de FAEE de cerca de 2,5 g/L. O perfil de produção é mostrado na Figura 6. O rendimento de FAME foi de 9,3 g de FAME por 100 g de glicose ou 23,3 g de FAME por 100 g de carbono na fonte de carbono. O rendimento de FAEE foi de 1,6 g de FAEE por 100 g de glicose ou 3,9 g de FAEE por 100 g de carbono na fonte de carbono. O rendimento de produto total (FAME + FAEE) por quantidade de glicose usada foi de 10,9 g de produto por 100 gramas de glicose ou 27,2 g por 100 g de carbono na fonte de carbono.

[0327] O lado B do FAME e do FAEE produzidos neste processo incluiu ácidos graxos de diferentes comprimentos e de nível de saturação. Os principais componentes das misturas de ésteres graxos produzidos neste processo: C1:C12 (metil laurato), C1:C14 (metil miristato), C1:C16 (metil palmitato), C1:C16:1 (metil palmitoleato), e C1:C18:1 (metil vaccenato); C2:C12 (etil laurato), C2:C14 (etil miristato), C2:C16 (etil palmitato), C2:C16:1 (etil palmitoleato), e C2:C18:1 (etil vaccenato). Um diagrama com a distribuição percentual de cada éster metílico e etílico sob as condições de produção do exemplo atual é mostrado na Figura 7.

Exemplo 2. Produção de FAEE Sem Etanol Exógeno, Alimentação Única de Metanol

[0328] A cepa $\Delta 4$ de *E. coli* modificada (descrita no Exemplo 1) portando o plasmídeo *'tesA*, *fadD* e *atfA1* foi crescida em fermentadores sob condições aeróbias favoráveis ao crescimento e produção de ésteres metílicos de ácido graxo. As células foram inicialmente crescidas com excesso de glicose e excesso de oxigênio. Nenhuma acumulação de etanol foi observada. Após a indução, a cultura foi mantida com uma alimentação de glicose mais baixa do que o consumo, de modo que a glicose não se acumulasse. A glicose foi alimentada a uma taxa mais rápida do que no Exemplo 1. Metanol foi adicionado somente uma vez até uma concentração de cerca de 10 g/L. Em uma porção inicial da fermentação, os resultados foram similares àqueles do Exemplo 1 com 78% de FAME e 22% de FAEE. Entretanto, mais tarde, durante a corrida, o consumo de glicose caiu, a glicose acumulada no fermentador e a concentração de metanol diminuiu para cerca

de 5 g/L. Neste mesmo momento, a cultura quase parou de produzir FAME e aumentou a produção de FAEE até uma distribuição final de 62% de FAME e 38% de FAEE. A concentração final de FAEE foi maior que 5 g/L. O perfil de fermentação é mostrado na Figura 8. A Figura 9 apresenta a distribuição percentual do FAME e FAEE produzidos, diferenciados pelo seu lado B (componente de ácido graxo). O rendimento de FAME foi de 6,5 g de FAME por 100 g de glicose ou 16,3 g de FAME por 100 g de carbono na fonte de carbono. O rendimento de FAEE foi de 4,0 g de FAEE por 100 g de glicose ou 10,1 g de FAEE por 100 g de carbono na fonte de carbono. O rendimento de produto total (FAME + FAEE) por quantidade de glicose usada foi de 10,5 g de produto por 100 gramas de glicose ou 26,4 g por 100 g de carbono na fonte de carbono. Todo o FAME e o FAEE descrito no Exemplo 1 estavam presentes neste caso.

Exemplo 3. Produção de FAEE Sem Álcool Exógeno

[0329] A cepa ID1 de *E. coli* (MG1655 $\Delta fadE$ com um operon contendo os genes *tesA*, *fadD* e *atfA1* integrados no cromossomo sob o controle do promotor Trc, construído de acordo com o Exemplo 1) foi crescida em fermentadores sob condições favoráveis para o crescimento e produção de ácidos graxos livres.

[0330] As células foram inicialmente crescidas com excesso de glicose (5 g/L) e suprida uma alimentação de glicose exponencial e mineral para permitir o crescimento de células em uma taxa de 0,3 h⁻¹; esta alimentação foi seguida por um esquema de alimentação fixado. A cultura foi mantida completamente aeróbia durante a corrida. Nenhum álcool

exógeno foi adicionado ao meio. Pequenas quantidades de etanol foram produzidas, e os ácidos graxos livres foram produzidos em grandes quantidades. A rota de ácido graxo modificado incluiu uma enzima éster sintase, a principal enzima responsável pela produção de ésteres na presença de álcoois adicionados. Neste caso, o etanol produzido endogenamente foi suficiente para agir como matéria-prima para a enzima éster sintase juntamente com os ácidos graxos livres acumulados, resultando na produção e acumulação de FAEE. Os perfis de acumulação de ácidos graxos, FAEE e etanol são mostrados na Figura 10 e na Figura 11. Os ácidos graxos livres se acumularam acima de 3 g/L em 43 h, enquanto FAEE alcançou uma concentração de 1,2 g/L no mesmo tempo. A Figura 12 mostra a composição relativa de ácidos graxos livres e FAME produzidos pelo processo. O rendimento de FFA foi de 2,1 g de FFA por 100 g de glicose ou 5,2 g de FFA por 100 g de carbono na fonte de carbono. O rendimento de FAEE foi de 0,8 g de FAEE por 100 g de glicose ou 2,1 g de FAEE por 100 g de carbono na fonte de carbono. O rendimento combinado de FFA mais FAEE foi de 2,9 g por 100 g de glicose ou 7,3 g por 100 g de carbono na fonte de carbono.

Exemplo 4. Produção de FAEE Sem Álcool Exógeno em Células hospedeiras de Cianobactéria

[0331] Vetores apropriados são preparados de modo a produzir FAEE sem adição de álcoois exógenos às células hospedeiras cianobacterianas, incluindo, por exemplo, células de *Synechococcus* sp. PCC7002, *Synechococcus elongatus* PCC7942, ou *Synechocystis* sp. PCC6803. Genes apropriados, tais como, por exemplo, um plasmídeo contendo

um gene de tioésterase (por exemplo, *'tesA* de *E. coli*), um gene de graxo acil-CoA sintase (por exemplo, *fadD* de *E. coli*) e um gene de éster sintase (por exemplo, *atfA1* de *Alcanivorax borkumensis* cepa SK2), opcionalmente integrado no cromossomo sob o controle de um promotor apropriado (por exemplo, PTrc), são então clonados naqueles vetores. São também introduzidos um ou mais genes apropriados que promovem a produção de etanol, tais como, por exemplo, *pdc* [No. de Acesso no GenBank YP_163095], *adh* [No. de Acesso no GenBank YP_162971], *adhA* [No. de Acesso no GenBank AAA71935], *adhB* [No. de Acesso no GenBank AAC70367], de *Zymomonas mobilis*, ou *casA* [No. de Acesso no GenBank AAB51563], ou *casB* [No. de Acesso no GenBank AAB51564] de *Klebsiella oxytoca*, nessas células hospedeiras de modo que FAEE é produzido sem a adição de álcool exógeno.

[0332] Um vetor é construído para realizar a recombinação homóloga em *Synechococcus sp.* PCC7002 pAQ1 [No. de Acesso no GenBank NC_0050525] usando regiões homólogas de 500 pb correspondentes às posições 3301-3800 e 3801-4300. Um marcador selecionável, tal como um cassette de resistência a espectinomicina contendo o gene aminoglicosídeo 3'-adeniltransferase, *aad*, um promotor, e um terminador, é derivado do plasmídeo PCL1920 (de acordo com Lerner et al., *Nucleic Acids Res.* 18:4631 (1990)). Esse marcador selecionável é inserido nas regiões homólogas. Um plasmídeo, tal como pACYC177, é preparado de acordo com Chang, et al. *J. Bacteriol.* 134: 1141-1156 (1978). O promotor e o sítio de ligação a ribossomo de aminoglicosídeo fosfotransferase, *aph*, são adicionados seguidos por sítios únicos de clonagem apropriados que são, por exemplo, as seqüências de

reconhecimento *NdeI* e *EcoRI*. Este cassete de integração completo é sintetizado e clonado em um vetor pUC19 (New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA). O plasmídeo resultante, pLS9-7002, permite a clonagem e expressão de um gene estrangeiro e a entrega e integração estável *in-vivo* no pAQ1 de *Synechococcus* sp. PCC7002.

[0333] É criado um plasmídeo ou operon sintético contendo um gene de tioésterase (por exemplo, *'tesA* de *E. coli*), um gene de graxo acil-CoA sintase (por exemplo, *fadD* de *E. coli*) e um gene de éster sintase (por exemplo, *atfA1* de *Alcanivorax borkumensis* cepa SK2), e subsequentemente clonado nos sítios *NdeI* e *EcoRI* de pLS9-7002 abaixo do promotor *aph* e do sítio de ligação do ribossomo. Da mesma forma, é introduzido um gene codificante de uma enzima que promove a produção de etanol como aqui descrito. O plasmídeo resultante é então transformado em *Synechococcus* sp. PCC7002 usando um método descrito por Stevens *et al.*, *PNAS* 77:6052-56 (1980).

[0334] Em algumas concretizações, outro vetor é construído para recombinação homóloga no genoma de *Synechococcus elongatus* PCC7942 (No. de Acesso no GenBank CP_000100) usando regiões homólogas de 800 pb correspondentes às posições 2577844-2578659 e 2578660-2579467. Esta localização cromossômica é conhecida como um sítio neutro (NS1) (Mackey *et al.*, *Meth. Mol. Biol.* 362:115-129 (2007). Um marcador selecionável, tal como, por exemplo, um cassete de resistência a espectinomicina, é derivado e introduzido como acima descrito. Este cassette de integração é sintetizado e clonado no pUC19 (New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA). O plasmídeo resultante, pLS9-7942-NS1, permite

a clonagem e expressão de um gene estrangeiro e entrega e integração estável no genoma de *Synechococcus elongatus* PCC7942. Um plasmídeo ou operon sintético, compreendendo um gene de tioésterase, um gene de acil-CoA sintase e um gene de éster sintase, é criado como descrito acima, o qual é depois clonado no sítio *NdeI* ou *EcoRI* de pLS9-7942-NS1. Um gene codificante de uma enzima promotora de produção de etanol como aqui descrito é, da mesma forma, introduzido. O plasmídeo resultante é transformado dentro de *S. elongatus* PCC7942 de acordo com um método descrito por Mackey *et al.*, acima mencionado.

[0335] Em algumas concretizações, outro vetor, ainda, é construído para recombinação homóloga no genoma de *Synechocystis* sp. PCC6803 (Acesso no GenBank BA_000022) usando regiões homólogas de 1300 a 1700 pb correspondentes às posições 2299015-2300690, e 2300691-2302056, respectivamente. Esta localização cromossômica é conhecida como sítio neutro RS1/2 (Shao *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.* 68:5026-33 (2002)). Um plasmídeo, tal como pACYC177, é preparado de acordo com Chang, *et al.* *J. Bacteriol.* 134: 1141-1156 (1978). Como um marcador selecionável, um cassete de resistência a canamicina (contendo aminoglicosídeo fosfotransferase, *aph*, promotor, gene e terminador) é derivado do plasmídeo pACYC177, e é adicionado entre as regiões homólogas. Adicionalmente, os sítios únicos de clonagem, por exemplo, os sítios de reconhecimento *NdeI* e *XbaI* são adicionados. Este cassete de integração é sintetizado e clonado no pUC19 (New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA). O plasmídeo resultante, pLS9-6803-RS, permite a clonagem e expressão de um gene

estrangeiro e entrega e integração estável no genoma de *Synechocystis* sp. PCC6803.

[0336] Em algumas concretizações, outro vetor, ainda, é construído para recombinação homóloga no genoma de *Synechocystis* sp. PCC6803 (Acesso no GenBank BA_000022) usando regiões homólogas de 1300 a 1700 pb correspondentes às posições 2299015-2300690, e 2300691-2302056, respectivamente. Esta localização cromossômica é conhecida como sítio neutro RS1/2 (Shao *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.* 68:5026-33 (2002)). Um plasmídeo, tal como pACYC177, é preparado de acordo com Chang, *et al.* *J. Bacteriol.* 134: 1141-1156 (1978). Como um marcador selecionável, um cassete de resistência a canamicina (contendo aminoglicosídeo fosfotransferase, *aph*, promotor, gene e terminador) é derivado do plasmídeo pACYC177, e é adicionado entre as regiões homólogas. Adicionalmente, os sítios únicos de clonagem, por exemplo, os sítios de reconhecimento *NdeI* e *XbaI* são adicionados. Este cassete de integração é sintetizado e clonado no pUC19 (New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA). O plasmídeo resultante, pLS9-6803-RS, permite a clonagem e expressão de um gene estrangeiro e entrega e integração estável no genoma de *Synechocystis* sp. PCC6803.

Exemplo 5. Produção de FAEE Sem Álcool Exógeno em Levedura

[0337] Um vetor pFBAIN-MOD-1 é construído de acordo com o método descrito no PCT Publicação WO2008/147935, cujas descrições são aqui incorporadas a título de referência. Este vetor é depois digerido com enzimas de restrição apropriadas, tais como, por exemplo, *NcoI* e *NotI* (New England

Biolabs, Inc., Ipswich, MA). Um plasmídeo ou operon sintético, contendo um gene de tioésterase, um gene de graxo acetil-CoA sintase e um gene de éster sintase, é criado como acima descrito, o qual é depois inserido no vetor pré-digerido pFBAIN-MOD-1 sob condições de ligação padrão. Um gene codificante de uma enzima promotora de produção de etanol como aqui descrita é opcionalmente da mesma forma introduzido. Esta mistura de ligação é depois incubada à temperatura ambiente por 2 h e usada para transformar uma célula apropriada competente, tal como, por exemplo, células Competentes *E. coli* Top10 (Life Technologies, Carlsbad, CA). O DNA plasmidial oriundo de transformantes é recuperado usando um kit Qiagen Miniprep. Os clones corretos são identificados por mapeamento de restrição.

[0338] Um clone correto é depois transformado em uma célula hospedeira de levedura apropriada tal como uma célula de *Yarrowia lipolytica*, por exemplo, Y_FOAR^R. Y_FOAR^R é preparada por obter células de *Yarrowia lipolytica* ATCC#20362 e plaqueá-las em uma placa de YPD agar (contendo 10 g/L de extrato de levedura (DIFCO, Detroit, MI), 20 g/L de bacto peptona (DIFCO, Detroit, MI), e 20 g/L de glicose). As células são então esfregadas sobre uma placa de Meio Mínimo (MM) (contendo 75 mg/L de cada um de uracila e uridina, 6,7 g/L YNB (base de nitrogênio de levedura) com sulfado de amônio, sem aminoácidos, e 20 g/L de glicose) contendo 250 mg/L de 5-FOA (Zymo Research, Orange, CA). As placas são incubadas a 28°C, e as colônias resultantes são aplicadas separadamente sobre placas MM contendo 200 mg/L de 5-FOA e placas MM faltando uracila e uridina. A auxotrofia de Ura3 é assim obtida e a cepa resultante é a cepa Y_FOAR^R.

[0339] As células oriundas da transformação são plaqueadas sobre placas MM faltando uracila (0,17% YNB (DIFCO Labs, Detroit, MI) sem sulfato de amônio ou aminoácidos, 2% de glicose, 0,1% de prolina, pH 6,1, 20 g/L de agar) e mantidas a 30°C por 2 dias. Os transformantes são coletados e são opcionalmente usados para fermentação sob condições apropriadas para produzir ésteres etílicos de ácido graxo. Por exemplo, uns poucos transformantes são então usados para inocular 25 mL de cultura em meio MM sem sulfato de amônio ou aminoácidos, 2% de glicose, 0,1% de prolina, pH 6,1. Cada cultura é deixada a crescer por 2 dias a 30°C, depois é trocada para 25 mL de HGM (Meio de Alto Crescimento contendo 80 g/L de glicose, 2,58 g/L de KH_2PO_4 , 5,36 g/L de K_2HPO_4) e deixadas a crescer por cerca de 5 dias a 30°C. Os lipídeos totais são extraídos e a produção de ésteres etílicos de ácido graxo é verificada e medida usando os métodos aqui descritos.

EQUIVALENTES

[0340] Apesar de exemplos específicos das invenções objeto da presente descrição terem sido explicitamente descritos aqui, a descrição e exemplos aqui fornecidos são ilustrativos e não restritivos. Muitas variações das invenções ficarão evidentes àqueles versados na técnica após terem revisto esta descrição, incluindo os exemplos. O completo escopo das invenções deve ser determinado com referência aos exemplos, juntamente com seu completo escopo dos equivalentes, e a descrição, juntamente com tais variações.

[0341] Todas as publicações, patentes, pedidos de patente e outras referências citadas nesta descrição são aqui incorporadas a título de referência na sua integralidade como se cada publicação, patente, pedido de patente ou outra referência fosse especificamente e individualmente indicada para ser incorporada como referência.

REIVINDICAÇÕES

1. Método fermentativo para produzir um éster de ácido graxo empregando um micro-organismo geneticamente modificado selecionado de uma célula de *Escherichia coli*, uma célula de levedura recombinante e uma célula de cianobactéria recombinante caracterizado pelo fato de que o método compreende o cultivo do micro-organismo recombinante, em que o micro-organismo recombinante superexpressa *tesA* tendo No. de Acesso GenBank AAC73596 ou *POADA1*, *fadD* tendo No. de Acesso GenBank AAC74875 e *atfA1* tendo No. de Acesso GenBank AA017391, e em que a expressão *fabR* é reduzida na ausência de álcool exógeno, em que o micro-organismo recombinante produz um éster de ácido graxo quando cultivado na presença de uma fonte de carbono de carboidrato, e em que o éster de ácido graxo produzido é um ou ambos dentre os ésteres metílico de ácido graxo ("FAME") e etílico de ácido graxo ("FAEE") e é selecionado do grupo consistindo em C1:C12 (metil laurato), C1:C14 (metil miristato), C1:C16 (metil palmitato), C1:C16:1 (metil palmitoleato), e C1:C18:1 (metil vaccenato); C2:C12 (etil laurato), C2:C14 (etil miristato), C2:C16 (etil palmitato), C2:C16:1 (etil palmitoleato), e C2:C18:1 (etil vaccenato).

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o éster de ácido graxo é o FAME.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o éster de ácido graxo é o FAEE.

4. Método, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o micro-organismo é

geneticamente modificado para superexpressar, pelo menos, um gene selecionado do grupo consistindo no *pdh*, *adh*, *adhA*, *adhB*, *pdh* e *casAB*, relativos a um micro-organismo de tipo selvagem correspondente.

5. Método, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o micro-organismo é geneticamente modificado para ter expressão reduzida de, pelo menos, um dentre os genes selecionados do grupo consistindo no *frd*, *ldhA*, *pflA*, *pflB*, *adhE*, *ackA* e *focA*, relativos a um micro-organismo de tipo selvagem correspondente.

6. Método para a produção de ésteres de ácidos graxos caracterizado pelo fato de que o método compreende a cultura de um micro-organismo geneticamente modificado na ausência de álcool exógeno, em que o micro-organismo é geneticamente modificado para produzir um ácido graxo e, pelo menos, uma proteína de éster sintase (EC 2.3.1.20 ou EC 2.3.1.75).

7. Método, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que, pelo menos, uma proteína de éster sintase é superexpressa.

8. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a etapa de isolamento do éster de ácido graxo.

9. Método, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o micro-organismo é, adicionalmente, geneticamente modificado para produzir etanol.

10. Método, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o éster de ácido graxo é o FAEE.

11. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de que o micro-organismo recombinante é cultivado em um meio de cultura compreendendo uma concentração inicial de 2g/L a 50g/L de glicose.

12. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 11, caracterizado pelo fato de que o éster de ácido graxo é produzido com um rendimento de 10% a 95% em massa de carbono da glicose presente no meio de fermentação.

13. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 11, caracterizado pelo fato de que o éster etílico de ácido graxo é produzido com um rendimento de 0,5 g a 50 g por 100 g de glicose presente no meio de fermentação.

FIGURA 1

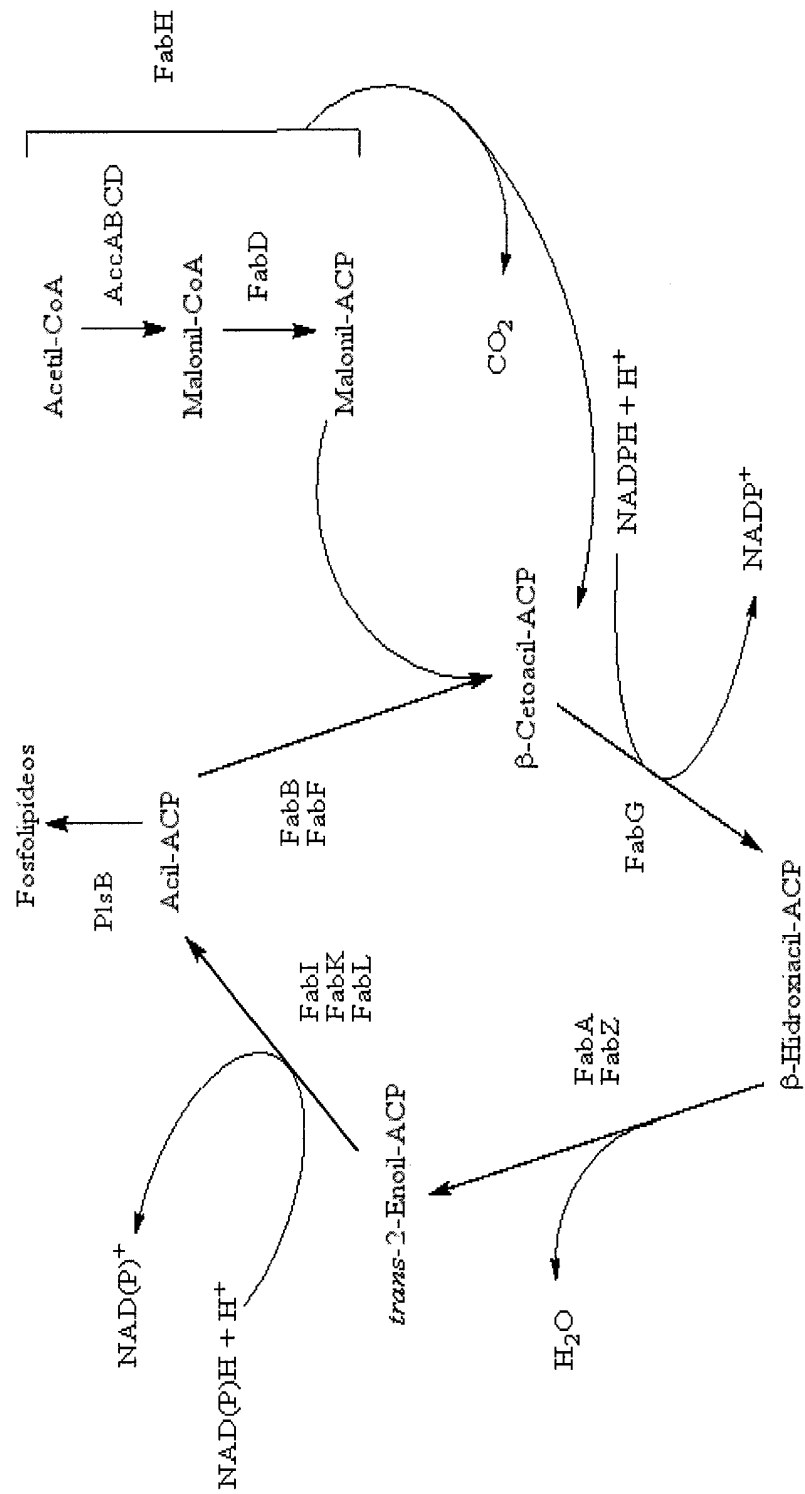


FIGURA 2

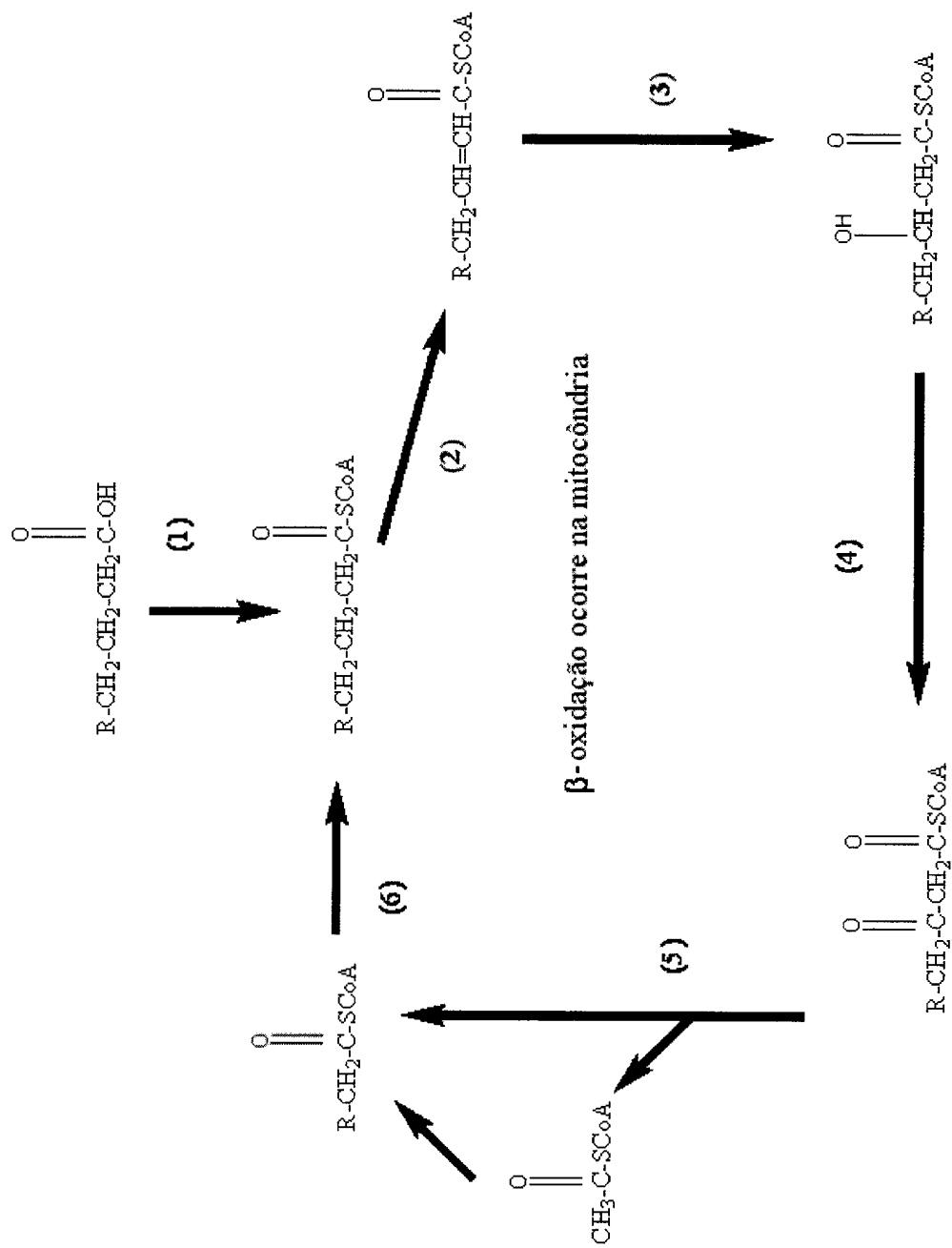
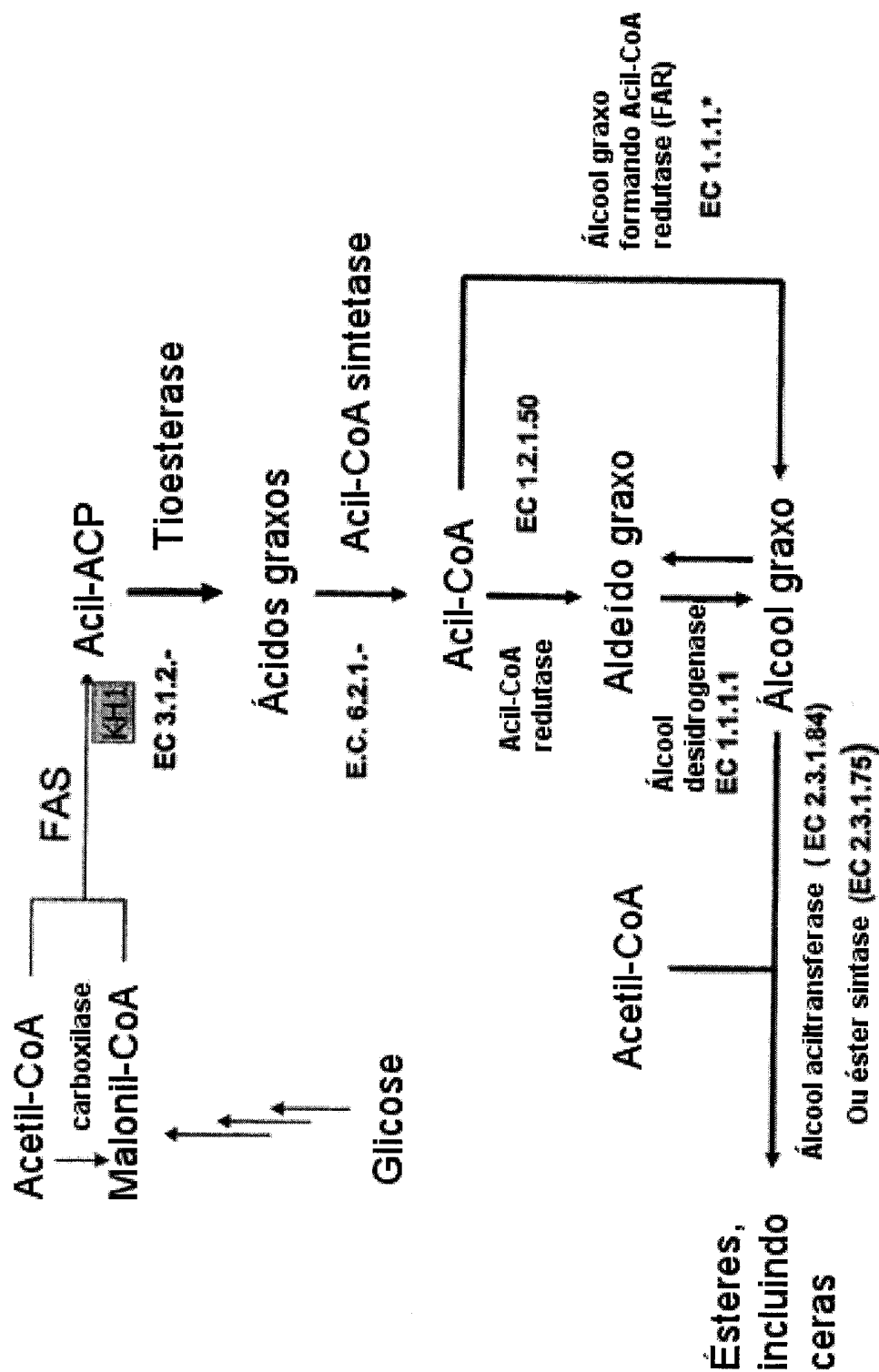


FIGURA 3



Referências de álcool graxo formando acil-CoA redutase: Kalscheuer 2003; Metz 2000; Cheng 2004a

FIGURA 5

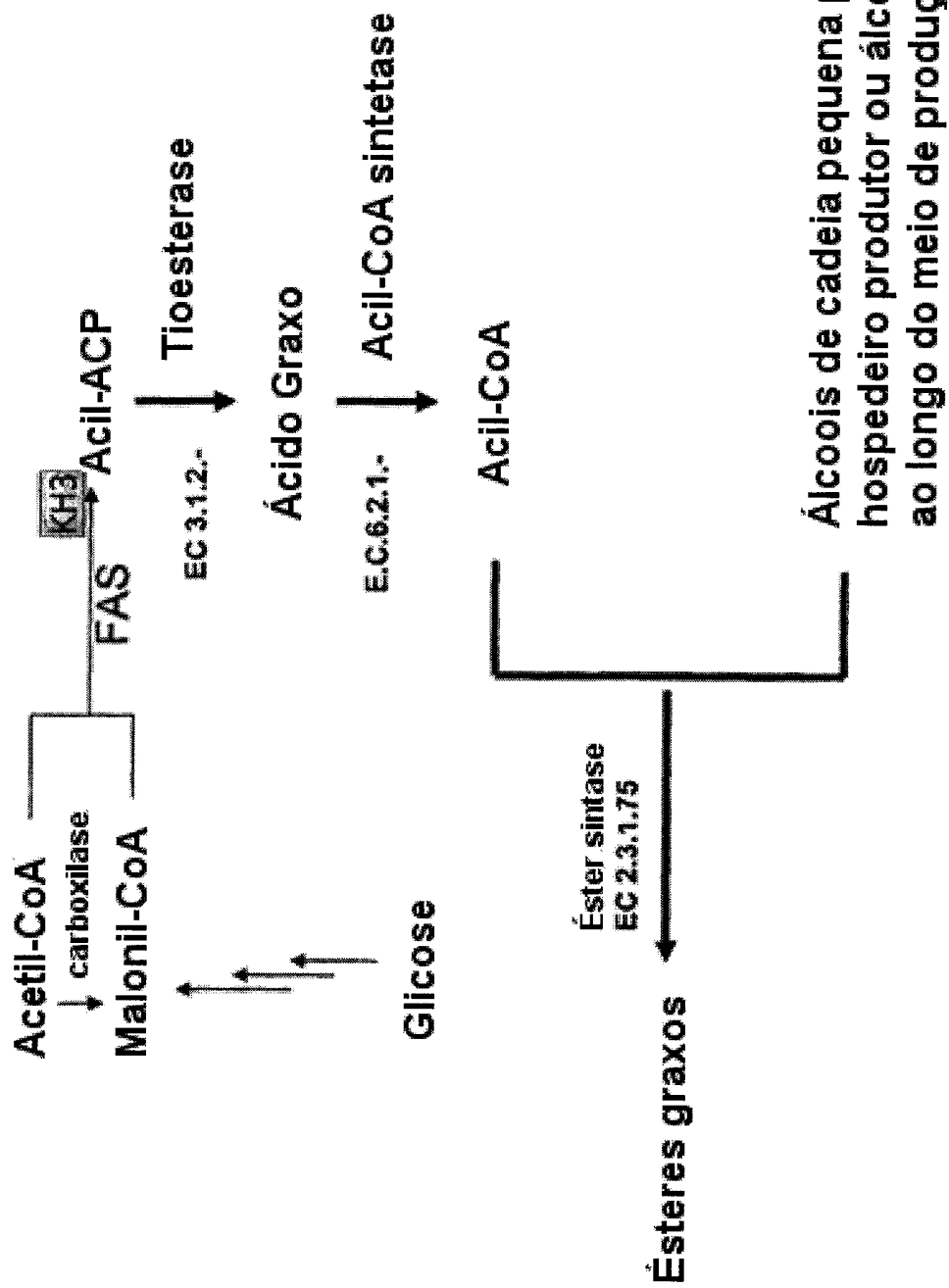


FIGURA 6

Produção de FAME e FAEE

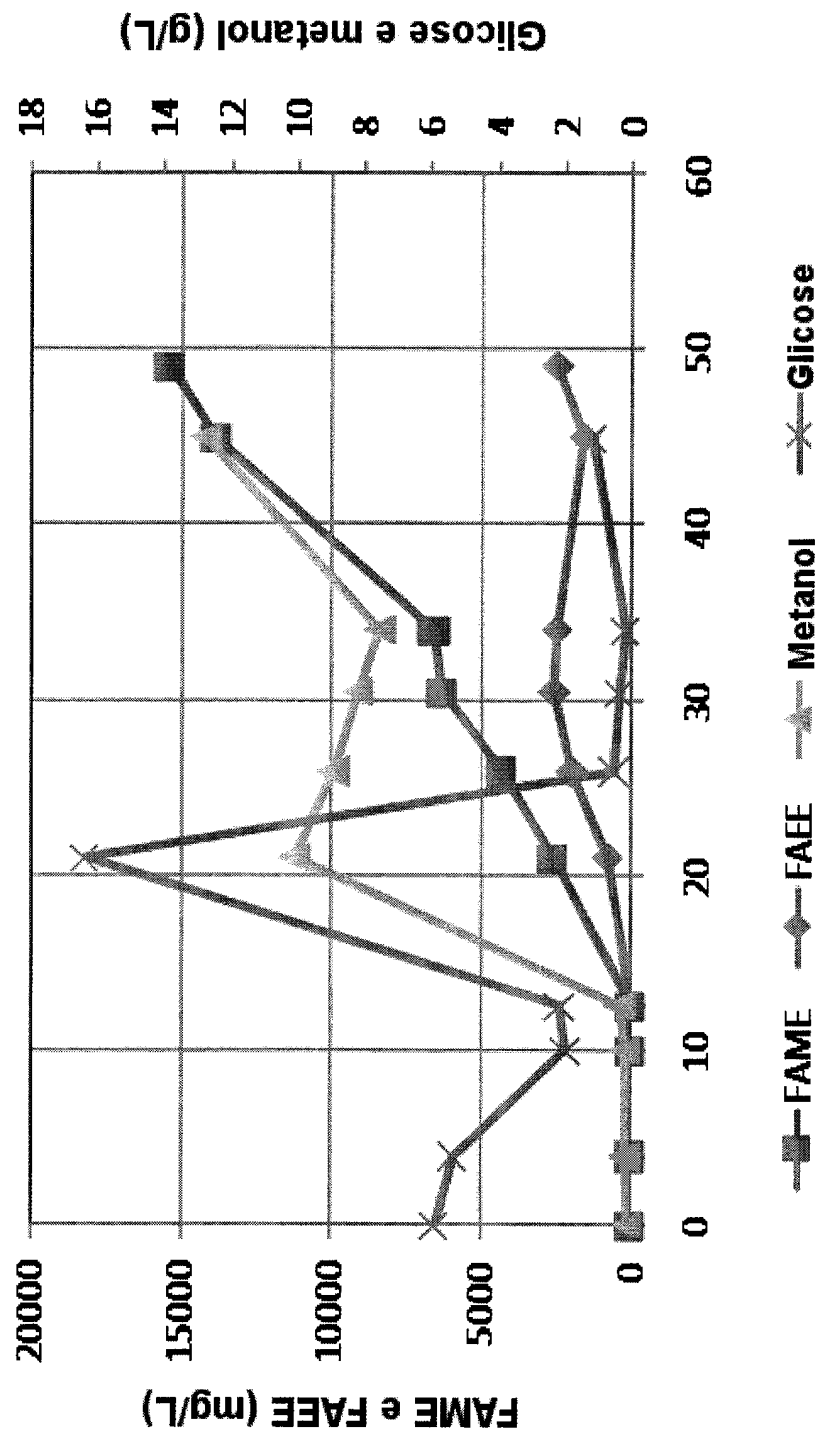


FIGURA 7

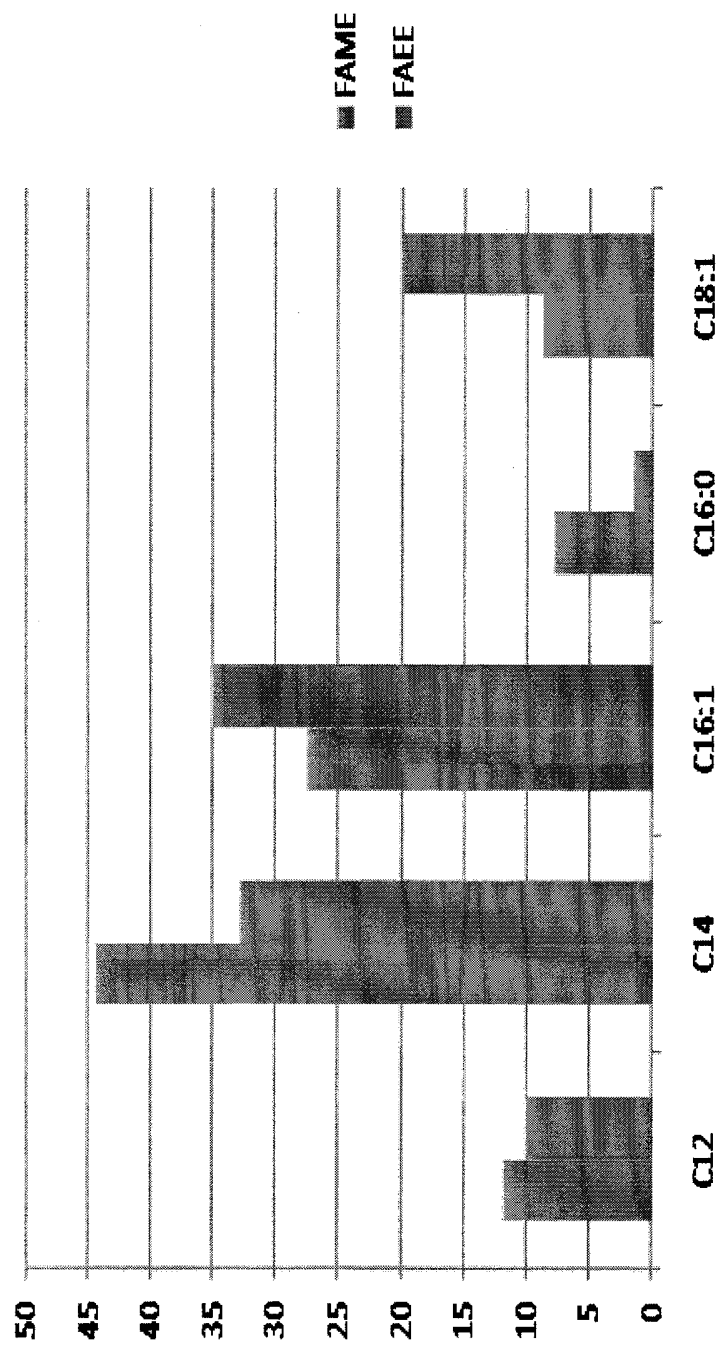
Composição de FAME e FAEE em % de totais individuais

FIGURA 8

Produção de FAME e FAEE

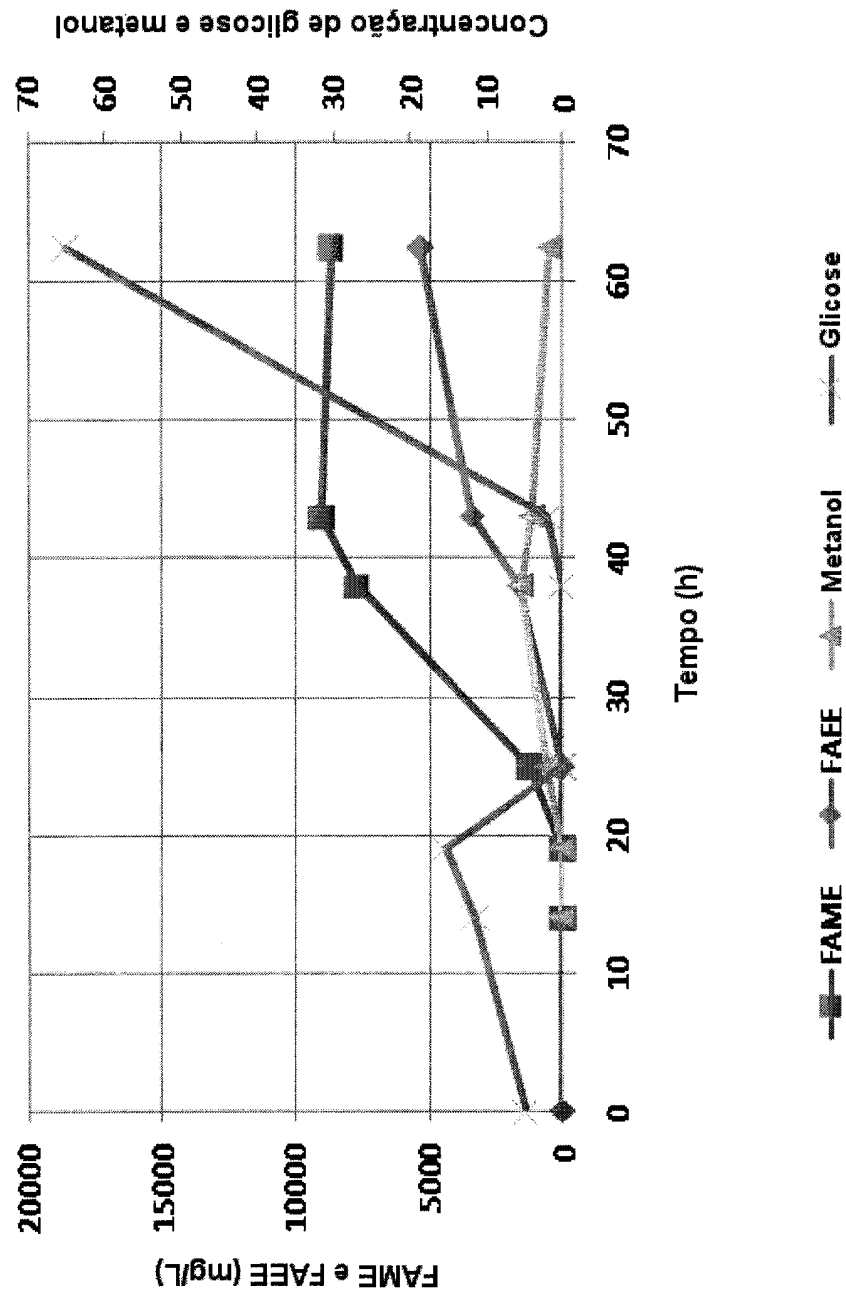


FIGURA 9

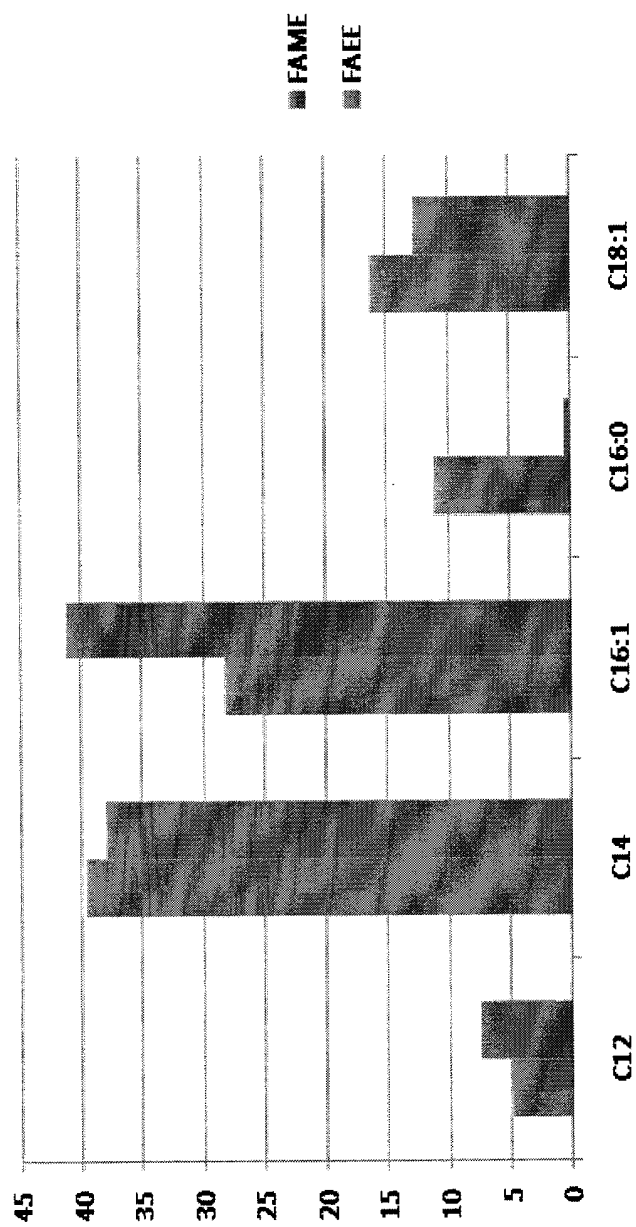
Composição de FAME e FAEE em % de totais individuais

FIGURA 10

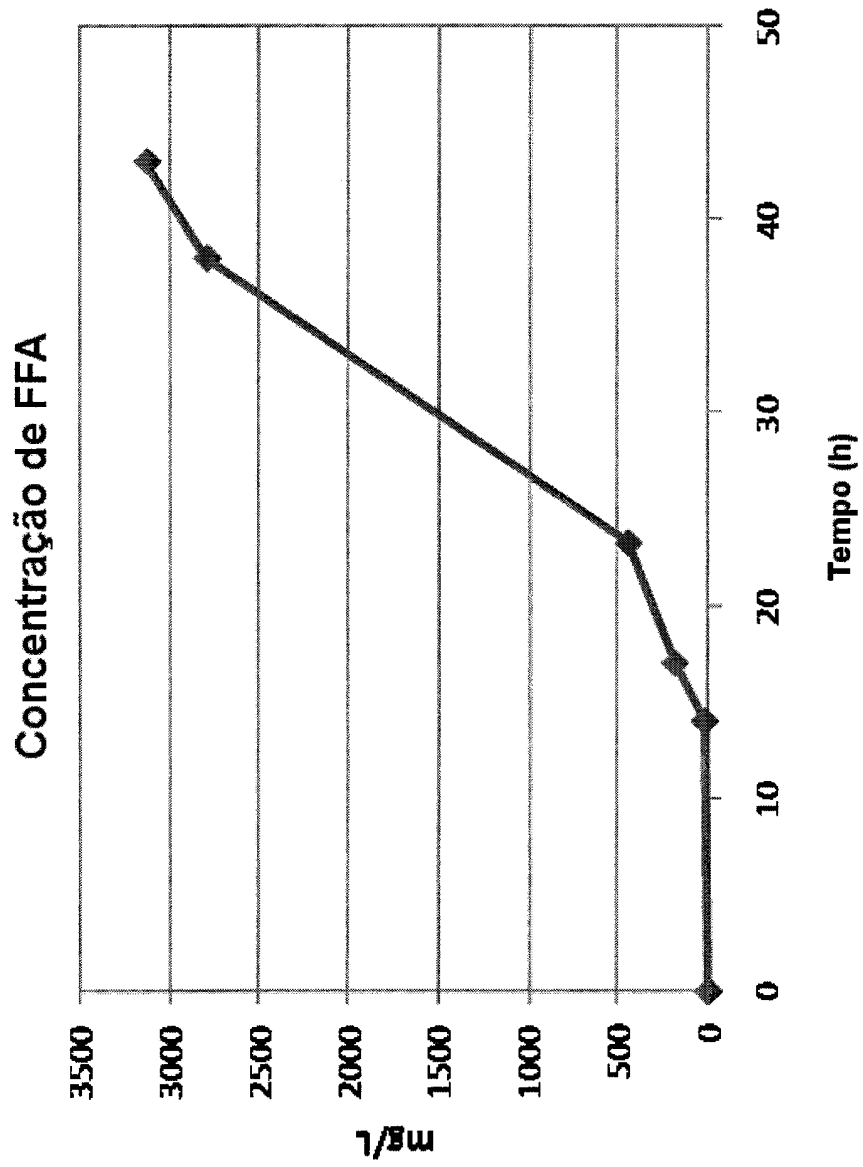


FIGURA 11

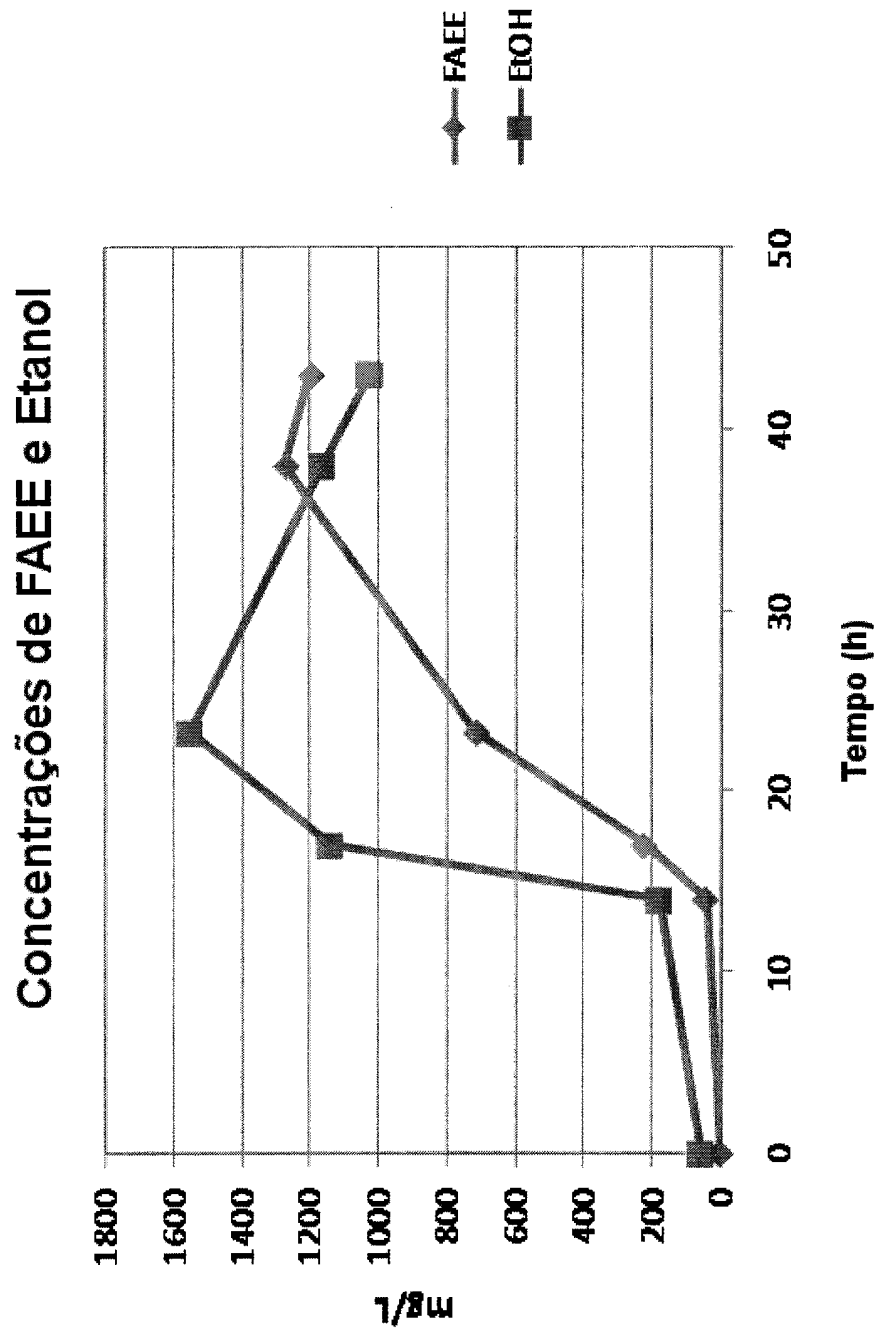


FIGURA 13

