



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

(11) PI 0813187-2 B1

(22) Data do Depósito: 25/06/2008

(45) Data de Concessão: 10/05/2022



(54) Título: 13-HIDROPERÓXIDO LIASES MODIFICADAS E RESPECTIVOS USOS

(51) Int.Cl.: C12N 9/88.

(30) Prioridade Unionista: 28/06/2007 EP 07111337.7.

(73) Titular(es): FIRMENICH SA.

(72) Inventor(es): BRÜHLMANN, FREDI; FOURAGE, LAURENT; WAHLER, DENIS.

(86) Pedido PCT: PCT IB2008052539 de 25/06/2008

(87) Publicação PCT: WO 2009/001304 de 31/12/2008

(85) Data do Início da Fase Nacional: 24/12/2009

(57) Resumo: 13-HIDROPERÓXIDO LIASES MODIFICADAS E RESPECTIVOS USOS. A presente invenção diz respeito a proteínas 13-hidroperóxido liase de ácido graxo que foram modificadas com relação à 13-hidroperóxido liase de goiaba anteriormente descrita e as sequências de ácido nucleico que codificam essas proteínas. A presente invenção também diz respeito aos meios para expressão das 13-hidroperóxido liases modificadas e aos métodos para usar essas liases no campo da síntese orgânica.

13-HIDROPERÓXIDO LIASES MODIFICADAS E RESPECTIVOS USOS

Campo da invenção

A presente invenção diz respeito a proteínas 13-hidroperóxido liase de ácido graxo que foram modificadas com relação à 13-hidroperóxido liase de goiaba
5 anteriormente descrita e as sequências de ácido nucleico que codificam essas proteínas. A presente invenção também diz respeito aos meios para expressão das 13-hidroperóxido liases modificadas e aos métodos para usar essas liases no campo da síntese orgânica.

Histórico da técnica

- 10 Dentre os compostos úteis nos setores de perfumaria e aromatizantes envolvendo a clivagem do hidroperóxido, possivelmente realizado via reação enzimática, as chamadas “notas verdes” incluem n-hexanal, hexan-1-ol, 2-(E)-hexen-1-al, 2-(E)-hexen-1-ol, 3-(Z)-hexen-1-ol e 3-(Z)-hexen-1-al, amplamente utilizados em sabores, principalmente os sabores de frutas, para transmitir uma característica verde e
15 fresca. Além disso, as notas verdes são essenciais para aromas de frutas e são amplamente usadas na indústria de aromas. A demanda por notas verdes naturais tem crescido mais que sua oferta a partir das fontes naturais, como o óleo de menta (*Mentha arvensis*). Este fato tem motivado os esforços de pesquisa para encontrar maneiras naturais e alternativas para se obter esses materiais.
- 20 A síntese de compostos de notas verdes começa a partir de ácidos graxos livres (poli-insaturados) como o ácido linoleico (9-(Z),12-(Z)-octadecadienoico) e α -linolênico (9-(Z),12-(Z),15-(Z)-octadecatrienoico). Na natureza, esses ácidos são liberados das membranas celulares por enzimas lipolíticas depois de um dano celular. Os 13-hidroperóxidos de ácido graxo são formados pela ação de uma 13-
25 lipoxigenase (13-LOX) e são posteriormente clivadas por uma 13-hidroperóxido liase

específica (13-HPOL) em um aldeído C_6 e em uma porção ω -oxoácido C_{12} . Os aldeídos podem posteriormente ser submetidos a isomerização térmica e/ou redução por enzimas desidrogenase para produzir outros produtos C_6 (ou seja, notas verdes) como álcoois (Hatanaka A. (1993) *Phytochemistry* 34: 1201 - 1218; Hatanaka A. et al. (1987) *Chemistry and Physics of Lipids* 44: 431 - 361).

A goiaba foi identificada como uma excelente fonte de 13-HPOL estável sob congelamento para uso nessas vias sintéticas. A 13-HPOL é atualmente usada em um processo industrial para produção de notas verdes (US 5,464,761). Nesse processo, é feita uma solução dos 13-hidroperóxidos necessários a partir de ácido linoleico ou linolênico (obtidos a partir de óleos de girassol e de linhaça, respectivamente) usando farinha de soja recém-preparada como fonte de 13-LOX. Essa solução é então misturada com um purê recém-preparado com goiabas (*Psidium guajava*) inteiras como fonte para 13-HPOL. Os aldeídos produzidos são depois isolados por destilação. Quando forem necessários os álcoois correspondentes, fermento de pão fresco é adicionado à solução de hidroperóxido, antes que seja misturada com o purê de goiaba. O fermento contém uma enzima desidrogenase ativa para álcool, que reduz os aldeídos aos álcoois correspondentes conforme os aldeídos são formados pela 13-HPOL.

Existem várias desvantagens neste processo industrial. A principal desvantagem é a necessidade de grande quantidade de goiabas frescas. Isso significa que o processo precisa ser operado em um país onde haja goiabas à disposição a custo baixo ou sem custo. Mesmo se tal local for encontrado, a disponibilidade é limitada pela safra da fruta. Existem goiabas de boa qualidade disponíveis, por exemplo, durante apenas dez meses ao ano no Brasil.

Uma segunda desvantagem é que a atividade desejada para as enzimas é bastante

diluída nas fontes empregadas. Isso significa que precisam ser usadas quantidades relativamente grandes de farinha de soja (5%), purê de goiaba (41%) e fermento (22%). O grande volume dessas matérias-primas necessárias para a produção industrial representa restrições físicas para a produção de notas verdes que pode, 5 aumentar os custos do processo industrial.

Uma terceira desvantagem é ser um processo em lote de grande volume que, por sua natureza, não faz uso máximo da atividade catalítica da enzima 13-HPOL, requer trabalho relativamente intensivo e gera uma grande quantidade de material orgânico residual. O material orgânico residual deve posteriormente ser transportado 10 para compostagem ou descartado de alguma outra forma.

Para contornar algumas das desvantagens deste processo industrial, EP 1 080 205 apresenta proteínas 13-HPOL purificadas e recombinantes de goiaba, ácidos nucleicos, sistemas de expressão e seus métodos de uso. Percebeu-se, no entanto, ao usar a 13-hidroperóxido liase recombinante de goiaba para produzir aldeídos C₆, 15 que a produção dos produtos obtidos com a 13-hidroperóxido liase recombinante de goiaba ainda pode ser otimizada.

Assim, ainda há um forte interesse em fornecer enzimas 13-HPOL que permitam a expressão recombinante da enzima e que possam ser usadas para obter uma maior produção do produto desejado.

20 Os objetos da invenção supramencionados são resolvidos pelos polipeptídeos de 13-hidroperóxido liase, conforme a reivindicação 1. As aplicações preferíveis são representadas pelo assunto das sub-reivindicações.

Resumo da invenção

A presente invenção fornece um polipeptídeo de 13-hidroperóxido liase modificado 25 composto por uma sequência de aminoácidos com 1 a 40 alterações nos

aminoácidos, quando comparado à sequência de aminoácidos da proteína original, de acordo com o ID SEQ no. 1 e inclui pelo menos uma alteração em aminoácido em uma posição selecionada dentre o grupo composto pelas posições 3, 4, 5, 19, 208, 340, 342, 352, 354, 358, 359, 360, 371, 372, 375, 377, 382, 383, 387, 388, 389, 392, 393, 394, 395, 399 e 457 da proteína original, de acordo com o ID SEQ no. 1.

A presente invenção fornece ainda uma molécula isolada de ácido nucleico composta por uma sequência de nucleotídeos que codificam uma 13-hidroperóxido liase da presente invenção, moléculas de ácido nucleico recombinante que permitem a expressão da 13-hidroperóxido liase em células hospedeiras adequadas e células transgênicas com essas moléculas de ácido nucleico recombinante.

A presente invenção apresenta ainda um método para preparação de um polipeptídeo de 13-hidroperóxido liase da presente invenção, cultivando uma ou mais células transgênicas em condições que permitam a expressão do polipeptídeo e, opcionalmente, sua recuperação.

A presente invenção é direcionada para o uso da 13-hidroperóxido liase da presente invenção para clivagem de um 13-hidroperóxido de um ácido graxo poli-insaturado em um aldeído e um ácido oxocarboxílico.

Finalmente, a presente invenção fornece um método para produção de um aldeído, fornecendo uma 13-hidroperóxido liase consoante a presente invenção, entrando em contato com um 13-hidroperóxido de um ácido graxo poli-insaturado com a 13-hidroperóxido liase e recuperando o aldeído produzido ou o álcool correspondente, após a redução do aldeído.

Descrição detalhada da invenção

A presente invenção diz respeito a polipeptídeos de 13-hidroperóxido liase modificada, moléculas de ácido nucleico que codificam os polipeptídeos

modificados, meios para sua expressão e métodos para usar a 13-hidroperóxido liase modificada.

Surpreendentemente, os inventores descobriram que a introdução de alterações no aminoácido da sequência de aminoácidos da 13-hidroperóxido liase de goiaba, conforme revelado em EP 1 080 205, por métodos mutagênicos como *DNA shuffling* e *error-prone PCR*, produz enzimas modificadas com maior atividade enzimática quando comparadas com a enzima recombinante não modificada da goiaba. Além disso, descobriu-se que as células hospedeiras recombinantes que expressam a hidroperóxido liase exibem uma excelente estabilidade no armazenamento, ou seja, podem ser armazenadas por vários meses, particularmente se mantidas sob refrigeração. Outra vantagem da presente invenção é que as enzimas modificadas apresentam taxas altas de reação inicial, o que permite a produção de uma grande quantidade de produto em um curto período, usando apenas pequenas quantidades de biomassa recombinante. Além disso, é possível reutilizar as enzimas modificadas em outras reações. Finalmente, demonstrou-se que a qualidade dos produtos obtidos com as 13-hidroperóxido liases modificadas da presente invenção é superior à dos produtos existentes atualmente usados, por exemplo, em perfumaria, considerando-se que quase não há isomerização durante a formação do produto.

Na acepção da presente invenção, uma “liase” corresponde a uma proteína com pelo menos uma função liase, ou seja, a capacidade de catalisar a clivagem de uma molécula. Em particular, o termo “13-hidroperóxido liase” significa que a proteína liase é capaz de quebrar os 13-hidroperóxidos de ácidos graxos poli-insaturados. A 13-hidroperóxido liase é capaz, por exemplo, de quebrar um 13-hidroperóxido de ácido graxo do ácido linoleico ou do ácido linolênico em um aldeído C₆ e em uma porção oxoácido C₁₂.

Nos termos da invenção, “modificado” ou “variante” significa que a sequência de aminoácidos do polipeptídeo modificado ou variante é alterada, em comparação à sequência de aminoácidos da proteína original, de acordo com o ID SEQ no. 1.

Enzimas 13-HPOL modificadas podem ser obtidas por um especialista na técnica
5 por vários meios diferentes, como engenharia de DNA, por exemplo, incluindo síntese genética, mutagênese sítio-dirigida, mutagênese com saturação de sítio e qualquer outra tecnologia de evolução dirigida (mutagênese aleatória, shuffling, etc.) na qual as novas sequências de DNA sejam geradas para criar novas variantes (ou bibliotecas de novas variantes). Isso pode ser feito a partir de um único gene,
10 usando-se mutagênese aleatória (WO 2006/003298). Também se pode gerar diversidade a partir de vários genes parentais, usando-se uma etapa de recombinação em família por *shuffling* conforme descrito, por exemplo, em WO 00/09679. As variantes são então examinadas para selecionar, sob condições rigorosas, a atividade enzimática aprimorada. Essas variantes aprimoradas podem
15 posteriormente ser usadas na próxima rodada de evolução.

A sequência de aminoácidos da 13-hidroperóxido liase modificada apresenta de 1 a 40 alterações nos aminoácidos, preferivelmente de 5 a 35, também preferivelmente de 4 a 25, mais preferivelmente de 6 a 25, ainda mais preferivelmente de 10 a 30 e muito mais preferivelmente de 17 a 25 alterações nos aminoácidos em comparação
20 à sequência de aminoácidos da proteína original, de acordo com o ID SEQ no. 1.

O termo “proteína original” refere-se à enzima 13-hidroperóxido liase modificada, apresentada em EP 1 080 205, mas com a exclusão de 31 aminoácidos na terminação N, em comparação à sequência apresentada em EP 1 080 205. As enzimas com esta exclusão apresentaram melhor expressão, levando a uma maior
25 atividade catalítica em comparação às enzimas sem a exclusão. A sequência da

proteína original, de acordo com a presente invenção, está ilustrada no ID SEQ no. 1.

O termo “alteração nos aminoácidos”, como usado neste documento, deve compreender uma inserção de um ou mais aminoácidos entre dois aminoácidos, 5 uma exclusão de um ou mais aminoácidos ou uma substituição de um ou mais aminoácidos por um ou mais aminoácidos diferentes, em comparação com a sequência de aminoácidos da proteína original, conforme ilustrada no ID SEQ no. 1. As alterações nos aminoácidos podem ser facilmente identificadas por comparação da sequência de aminoácidos da proteína modificada com a sequência de 10 aminoácidos da proteína original.

As comparações das sequências de aminoácidos podem ser realizadas usando-se qualquer um dos algoritmos e programas de comparação de variedade de sequência conhecidos na área. Esses algoritmos e programas incluem, mas não estão de maneira alguma limitados ao BLASTP (Altschul et al. (1997) Nucl. Acids Res. 25: 15 3389 -- 3402; Schäffer et al. (2001) Nucl. Acids Res. 29: 2994 – 3005) ou ao BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>).

O termo “posição” se refere a um resíduo específico de aminoácido presente na proteína original, identificado por uma numeração específica dos aminoácidos. É perceptível para o especialista que a inserção ou exclusão de um ou mais resíduos 20 de aminoácido, em comparação à sequência original, causa uma diferença de numeração entre a sequência de aminoácidos original e a sequência de aminoácidos modificada. Se um aminoácido é inserido entre os aminoácidos 299 e 300 da sequência original, o aminoácido após a inserção terá número 301 em na sequência de um aminoácido modificado, enquanto mantém o número 300 na 25 sequência original.

A 13-hidroperóxido liase modificada da invenção pode compreender uma ou mais substituições, selecionadas do grupo formado por V3L, R4K, T5P, S19L, N208H, F340L, Y342F, K352R, K352S, H354Y, F358Y, D359E, V360I, K371P, V372L, T375R, P377S, E382D, P383A, N387K, S388A, D389E, V392M, Q393G, N394E,
5 D399S, D399N e N457K.

A 13-hidroperóxido liase modificada da presente invenção pode compreender pelo menos 3 dessas substituições, preferencialmente pelo menos 4, 5, 6, 7 ou 8, mais preferivelmente pelo menos 9, 10, 11, 12, 13 ou 14, ainda mais preferivelmente pelo menos 15, 16, 17 ou 18 e o mais preferivelmente 19, 20, 21, 22, 23, 24 ou 25
10 substituições com relação à sequência de aminoácidos da proteína original, de acordo com ID SEQ no. 1.

Preferivelmente, a 13-hidroperóxido liase modificada da presente invenção pode compreender pelo menos uma das seguintes substituições: V3L, R4K, T5P e N208H, quando comparada com a proteína original. Todas as variantes reveladas na
15 presente aplicação e que apresentam atividade aprimorada têm essas substituições. A variante D10A, por exemplo, que é apresentada na presente aplicação, compreende essas quatro substituições e as substituições adicionais V360I e D399N, em comparação à proteína original.

A hidroperóxido liase da invenção também pode compreender a inserção de
20 aminoácidos K e G entre as posições 394 e 395 da sequência de aminoácidos da proteína original. Como efeito dessa inserção, as sequências de aminoácidos por ela modificadas são dois aminoácidos mais longas que as sequências sem essa inserção. Além disso, qualquer mutação adicional após a inserção terá numeração diferente na sequência de aminoácidos original e na modificada. Por exemplo, o
25 resíduo de aminoácido 399 da sequência original corresponde ao resíduo de

aminoácido 401 na sequência modificada, devido à inserção.

A 13-hidroperóxido liase modificada da presente invenção pode ainda compreender as seguintes substituições: K371P, V372L, T375R, P377S, E382D, P383A, N387K, S388A, D389E, V392M, Q393G, N394E, D399S.

- 5 Outros exemplos da 13-hidroperóxido liase da invenção, designados GC7, E8B, B7A, C2A, AC5, 4E10 e 9D3, apresentam diferentes combinações de alterações nos aminoácidos, em comparação com a sequência de aminoácidos da proteína original. A variante GC7 apresenta 21 substituições de aminoácidos, a variante E8B apresenta 19 substituições de aminoácidos, a variante AC5 apresenta 24
- 10 substituições de aminoácidos, a variante C2A apresenta 22 substituições de aminoácidos, a variante B7A apresenta 21 substituições de aminoácidos, a variante 4E10 apresenta 15 substituições de aminoácidos e a 9D3 apresenta 25 substituições de aminoácidos, em comparação com a sequência de aminoácidos da proteína original, de acordo com ID SEQ no. 1. Essas sete variantes apresentam as
- 15 substituições V3L, R4K, T5P e N208H, assim como as substituições K371P, V372L, T375R, P377S, E382D, P383A, N387K, S388A, D389E, V392M, Q393G, N394E e D399S, em comparação com a sequência de aminoácidos da proteína original, de acordo com ID SEQ no. 1. Além disso, todas essas variantes apresentam ainda a inserção de aminoácidos K e G entre as posições 394 e 395 da sequência de
- 20 aminoácidos da proteína original. Todas as posições mencionadas neste documento se referem à posição na sequência de aminoácidos da proteína original, a menos que indicado em contrário.

A variante GC7 compreende, adicionalmente, as substituições de aminoácidos S19L, F340L, V360I e N457K. A variante E8B compreende, adicionalmente, as

25 substituições de aminoácidos F340L e N457K. A variante AC5 compreende,

adicionalmente, as substituições de aminoácidos S19L, F340L, Y342F, K352R, F358Y, V360I e N457K. A variante C2A compreende, adicionalmente, as substituições de aminoácidos F340L, Y342F, F358Y, D359E e V360I. A variante B7A compreende, adicionalmente, as substituições de aminoácidos S19L, F358Y, V360I e N457K. A variante 4E10 compreende, adicionalmente, a substituição de aminoácido V360I. A variante 9D3 compreende, adicionalmente, as substituições de aminoácidos S19L, F340L, Y342F, K352S, H354Y, F358Y, V360I e N457K.

Todas as variantes isoladas exemplificadas (D10A, GC7, E8B, B7A, C2A, AC5, 4E10 e 9D3) também incluem a sequência de aminoácidos ATPSSSSPE na extremidade da terminação N, o que resulta em uma maior atividade em comparação à das variantes sem essa inserção. Essa sequência adicional de aminoácidos deriva da 9-hidroperóxido liase de *Cucumis melo* (US 7,037,693) e está localizada nas posições 1 a 9 das sequências de aminoácidos, de acordo com ID SEQ nos. 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 e 16. O especialista está ciente de que a inserção da sequência de aminoácidos leva a uma diferença entre a numeração da proteína original e das variantes. Por exemplo, o aminoácido na posição 3 da proteína original corresponde ao aminoácido na posição 12 da variante.

Mais preferivelmente, a 13-hidroperóxido liase modificada consoante a presente invenção apresenta uma sequência de aminoácidos selecionada dentre o grupo formado por ID SEQ nos. 2 (variante GC7), 4 (variante E8B), 6 (variante AC5), 8 (variante C2A), 10 (variante B7A), 12 (variante D10A), 14 (variante 4E10) e 16 (variante 9D3).

As enzimas 13-hidroperóxido liase modificadas da presente invenção apresentam uma atividade enzimática maior em comparação com a 13-hidroperóxido liase original, de acordo com ID SEQ no. 1. O aumento na atividade é de pelo menos 10%

ou 20%, preferivelmente 30% ou 40%, ainda preferivelmente de pelo menos 50% ou 80%, especialmente preferivelmente de pelo menos 100% ou 200%, ainda especialmente preferivelmente um aumento em um fator de pelo menos 5, 7 ou 9, particularmente preferivelmente um aumento em um fator de pelo menos 10 ou 20, 5 ainda particularmente preferivelmente em um fator de pelo menos 50 ou 80 e mais preferivelmente em um fator de pelo menos 100. O termo "atividade enzimática aprimorada" refere-se à capacidade da enzima modificada de causar um fator de produção maior que o da enzima original. Por "fator de produção" entende-se a proporção entre a concentração de produto obtida e a concentração de 10 biocatalisador (enzima recombinante purificada ou um extrato das células hospedeiras ou das células recombinantes que expressam a enzima, por exemplo) no meio de reação. Os presentes inventores demonstraram que as 13-hidroperóxido liases modificadas da presente invenção causaram uma conversão de 100% do ácido 13-hidroperoxioctadecatrienoico do substrato, enquanto a 13-hidroperóxido 15 liase de goiaba original foi capaz de converter apenas cerca de 30% do mesmo substrato, mesmo com uma alta concentração de células.

A atividade da 13-hidroperóxido liase pode ser determinada incubando-se a enzima purificada ou extratos de células hospedeiras ou um organismo hospedeiro completo com um 13-hidroperóxido de um ácido graxo poli-insaturado como o ácido linolênico, 20 sob condições apropriadas, e analisando-se os produtos da reação, por exemplo por cromatografia gasosa ou análise por HPLC. Os detalhes dos ensaios de atividade enzimática e da análise dos produtos da reação são fornecidos abaixo, nos exemplos.

A presente invenção diz respeito ainda a moléculas isoladas de ácido nucleico 25 compostas por uma sequência de nucleotídeos que codifica uma 13-hidroperóxido

liase da presente invenção. O especialista tem ciência do fato de que, devido à degeneração do código genético, uma sequência específica de aminoácidos pode ser codificada por diferentes sequências de ácido nucleico. A invenção destina-se a compreender todas as sequências de nucleotídeos que codifiquem para as 13-

5 hidroperóxido liases da presente invenção.

Preferivelmente, a sequência de nucleotídeos que codifica para a 13-hidroperóxido liase modificada da presente invenção é selecionada dentre o grupo composto por ID SEQ nos. 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 e 17, codificando para as variantes de proteína GC7, E8B, AC5, C2A, B7A, D10A, 4E10 e 9D3, respectivamente.

10 Uma molécula “isolada” de ácido nucleico é separada das outras moléculas de ácido nucleico presentes no repositório natural de ácidos nucleicos. As moléculas de ácido nucleico da presente invenção, como por exemplo uma molécula de ácido nucleico com uma sequência de nucleotídeos de nos. 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 ou 17, ou parte desta, pode ser isolada ou produzida usando-se técnicas biológicas padrão e as

15 informações de sequenciamento aqui fornecidas.

A presente invenção diz respeito ainda a moléculas recombinantes de ácido nucleico compostas por uma sequência de nucleotídeos da presente invenção.

Para os fins da invenção, “transgênico” ou “recombinante” significa, com relação à sequência de ácido nucleico, por exemplo, um cassete de expressão (=construção

20 gênica) ou um vetor contendo a sequência de ácido nucleico consoante a invenção, ou um organismo transformado com as respectivas sequências de ácido nucleico, cassetes de expressão ou vetores, sendo todas as construções produzidas por meio de tecnologias genéticas, nas quais

a) a sequência de ácido nucleico consoante a invenção, ou

25 b) uma sequência de controle genético vinculada funcionalmente à sequência de

ácido nucleico consoante à invenção, como um promotor, ou

c) a) e b)

não está em seu ambiente genético natural, ou foi modificado por técnicas genéticas, sendo a modificação, por exemplo, uma substituição, adição, exclusão, inversão ou inserção de um ou vários resíduos de nucleotídeo. Ambiente genético natural significa o local genômico ou cromossômico no organismo parental, ou a existência em uma biblioteca genômica.

Outro aspecto da invenção diz respeito a organismos ou células hospedeiras nas quais foi introduzido um vetor de expressão recombinante da invenção. Os termos “célula hospedeira”, “célula transgênica” e “célula recombinante” são usados de maneira intercambiável neste documento. Entende-se que esses termos se referem não apenas à célula específica do caso, mas também à progenia ou possível progenia dessa célula . Como certas modificações podem ocorrer em gerações seguintes devido a mutações ou influências ambientais, tal progenia pode não ser, na realidade, idêntica à célula-mãe, mas ainda está incluída no escopo do termo, conforme usado neste documento.

Células hospedeiras para expressão de ácidos nucleicos, cassetes de expressão e vetores da invenção incluem bactérias, leveduras, fungos, células vegetais, plantas, células de insetos e células de mamíferos.

É óbvio para o especialista que a sequência de ácido nucleico que codifica uma 13-HPOL e que é usada para a produção da célula transgênica pode precisar ser ajustada ao uso do códon específico do organismo. O uso do códon pode ser determinado com análises por computador de outros genes conhecidos do organismo selecionado.

Depois da inserção em uma célula, os ácidos nucleicos usados no método podem se

localizar em um plasmídeo separado ou, vantajosamente, ser integrados ao genoma da célula hospedeira. No caso de integração ao genoma, a integração pode ocorrer aleatoriamente ou por meio de uma recombinação na qual o gene nativo é substituído pela cópia inserida, o que causa a modulação da expressão celular de

5 13-HPOL, ou usando um gene em trans de forma que o gene seja funcionalmente vinculado a uma unidade de expressão funcional que contém pelo menos uma sequência que garanta a expressão de um gene e pelo menos uma sequência que garanta a poliadenilação de um gene transcrito funcionalmente.

Além da sequência de ácido nucleico que codifica para a 13-HPOL a ser transferida,

10 as moléculas de ácido nucleico recombinante que são usadas para a expressão de 13-HPOL também contêm elementos regulatórios. Os elementos regulatórios específicos que os vetores devem conter dependem de cada caso, no processo no qual esses vetores serão usados. O especialista na área sabe quais elementos regulatórios e outros elementos uma molécula de ácido nucleico recombinante deve

15 conter.

Normalmente, os elementos regulatórios que fazem parte dos vetores são aqueles que permitem a transcrição e, se desejado, a tradução na célula bacteriana, de levedura, inseto, mamífero ou planta. Dependendo do organismo selecionado, isso pode significar, por exemplo, que o gene é expresso e/ou superexpresso apenas

20 após a indução, ou que é expresso e/ou superexpresso imediatamente. Por exemplo, essas sequências regulatórias são sequências às quais os indutores ou repressores se ligam, regulando assim a expressão do ácido nucleico. Além dessas novas sequências regulatórias, ou no lugar dessas sequências, ainda pode existir a regulação natural das sequências antes dos genes estruturais em si, e esta pode

25 possivelmente ter sido modificada geneticamente de forma que a regulação natural

dessa desativada e a expressão dos genes seja aumentada. A molécula de ácido nucleico recombinante, porém, também pode ser construída de maneira simples, ou seja, sem que sinais adicionais de regulação sejam inseridos antes da sequência de ácido nucleico e que o promotor natural, com sua regulação, não seja removido. Em 5 vez disso, a sequência regulatória natural foi modificada de tal forma que a regulação não mais ocorre e/ou a expressão dos genes aumenta. Para aumentar a atividade, esses promotores alterados também podem ser inseridos unicamente, na forma de sequências parciais, antes do gene natural. Além disso, a construção do gene pode conter, com vantagens, uma ou mais das chamadas sequências 10 ativadoras, que são funcionalmente vinculadas ao promotor e que permitem uma maior expressão da sequência de ácido nucleico. Outras sequências úteis, como elementos regulatórios adicionais ou terminadores, também podem ser inseridas na extremidade 3' das sequências de DNA.

Em princípio, é possível usar qualquer um dos promotores naturais, com suas 15 sequências de regulação, para o método consoante a invenção. Também é possível e vantajoso, no entanto, usar apenas promotores sintéticos ou incluí-los.

Os vetores consoante a invenção, como elementos regulatórios, podem adicionalmente compreender, por exemplo, elementos ativadores. Eles podem conter também genes de resistência, sinais de replicação e regiões adicionais de 20 DNA, que permitem a propagação dos vetores em bactérias como a *E. coli*. Os elementos regulatórios também compreendem sequências que afetam a estabilização dos vetores nas células hospedeiras. Esses elementos regulatórios compreendem, particularmente, sequências que facilitam a integração estável do vetor ao genoma hospedeiro ou uma replicação autônoma do vetor nas células. 25 Esses elementos regulatórios são conhecidos dos especialistas da área.

As chamadas sequências de terminação são sequências que asseguram a terminação adequada da transcrição ou tradução. Se os ácidos nucleicos transferidos precisam ser traduzidos, as sequências de terminação são geralmente códons de parada e as respectivas sequências regulatórias. Se os ácidos nucleicos transferidos vão ser apenas transcritos em eucariontes, geralmente são sequências poli(A).

Da forma como é usado neste documento, “vetor” diz respeito a uma molécula de ácido nucleico recombinante que pode transportar outro ácido nucleico, ao qual está ligado, para uma célula. Um tipo de vetor é o “plasmídeo”, representando um loop circular de cadeia dupla de DNA ao qual podem ser ligados segmentos adicionais de DNA. Outro tipo de vetor é o vetor viral, no qual segmentos adicionais de DNA podem ser ligados ao genoma viral. Certos vetores podem se replicar de forma autônoma em uma célula hospedeira na qual foram inseridos (vetores bacterianos com origem por replicação bacteriana, por exemplo). Outros vetores são integrados com vantagens ao genoma de uma célula hospedeira quando inseridos nesta e com isso se replicam juntamente com o genoma hospedeiro. Além disso, certos vetores podem controlar a expressão de genes aos quais estejam vinculados funcionalmente. Esses vetores são chamados aqui de “vetores de expressão”. Geralmente, vetores de expressão adequados para técnicas de recombinação de DNA são do tipo plasmídeo. Na presente descrição “plasmídeo” e “vetor” podem ser usados indistintamente, já que o plasmídeo é o tipo de vetor usado com maior frequência. No entanto, a invenção também pretende compreender outros tipos de vetores de expressão, como vetores virais que apresentam funções semelhantes. Além disso, o termo “vetor” também pretende compreender outros vetores conhecidos pelos especialistas, como fagos, vírus como SV40, CMV, TMV,

transpóson, elementos IS, fasmídeos, fagomídeos, cosmídeos, DNA linear ou circular.

Em um vetor com expressão recombinante, o termo “vinculado de maneira operativa a” ou “vinculado funcionalmente a” significa que a sequência de nucleotídeos de interesse está vinculada à(s) sequência(s) regulatória(s) de forma que a expressão da sequência de nucleotídeos é possível e que ambas as sequências sejam vinculadas uma à outra de forma a executar a função prevista relacionada à sequência.

O termo “sequência regulatória” pretende compreender promotores, ativadores e outros elementos de controle de expressão (sinais de poliadenilação, por exemplo).

Essas sequências de regulação são descritas, por exemplo, em Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990), ou por Gruber e Crosby, em: Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, CRC Press, Boca Raton, Flórida, Editor: Glick and Thompson, capítulo 7, 89-108. As

sequências regulatórias compreendem as sequências que regulam a expressão constitutiva de uma sequência de nucleotídeos em muitos tipos de células hospedeiras e as sequências que regulam a expressão direta da sequência de nucleotídeos apenas em certas células hospedeiras, sob certas condições. Os especialistas sabem que o design do vetor de expressão pode depender de fatores como a escolha da célula hospedeira a ser transformada, a extensão desejada para a expressão da proteína, etc.

Os vetores de expressão recombinantes usados para a expressão da 13-HPOL podem ser ativos em células procarióticas e eucarióticas. Isso é vantajoso, considerando que as etapas intermediárias da construção do vetor geralmente são realizadas em micro-organismos, para fins de simplicidade. Esses vetores de

clonagem contêm um sinal de replicação para o respectivo micro-organismo e um gene marcador para a seleção de células bacterianas transformadas com sucesso. Os especialistas da área conhecem os vetores adequados para expressão em organismos procarióticos. Eles incluem, por exemplo. *E. coli* pEXP5-NT/TOPO, série pMAL, pLG338, pACYC184, a série pBR, como pBR322, a série pUC, como pUC18 ou pUC19, a série M113mp, pKC30, pRep4, pHS1, pHS2, pPLc236, pMBL24, pLG200, pUR290, pIN-III113-B1, ϕ gt11 ou pBdCl, *Streptomyces* pIJ101, pIJ364, pIJ702 ou pIJ361, *Bacillus* pUB110, pC194 ou pBD214, *Corynebacterium* pSA77 ou pAJ667.

- 10 Em outra forma de execução, o vetor de expressão representa um vetor de expressão para levedura ou baculovírus.

Os vetores supramencionados representam apenas uma pequena visão geral dos possíveis vetores adequados. Outros plasmídeos são conhecidos do especialista e são descritos, por exemplo, em Cloning Vectors (editora Pouwels, P. H. et al.

- 15 Elsevier, Amsterdam, New York-Oxford, 1985). Para conhecer outros sistemas de expressão adequados para células procarióticas e eucarióticas, consulte os capítulos 15 e 16 de Sambrook and Russell, vide acima.

Em outra forma de execução do método, a 13-HPOL pode ser expressa em células de plantas unicelulares (como algas), vide Falciatore et al. (1999) Marine

- 20 Biotechnology 1(3): 239-251 e a literatura citada anteriormente neste documento, e em células de plantas superiores (espermatófitas, por exemplo, como plantas de cultivo). Exemplos de vetores de expressão de plantas compreendem aqueles amplamente descritos em: Becker et al. (1992) Plant Mol. Biol. 20: 1195-1197; e Bevan (1984) Nucl. Acids Res. 12: 8711-8721; Vectors for Gene Transfer in Higher
25 Plants; in: Transgenic Plants, Bd. 1, Engineering and Utilization, editora: Kung and R.

Wu, Academic Press, 1993, S. 15-38.

O gene a ser expresso deve, como descrito acima, ser funcionalmente ligado a um promotor adequado que regula a expressão gênica de maneira específica com relação ao momento, à célula ou ao tecido.

- 5 A fim de inserir a sequência de nucleotídeos da 13-HPOL nos vetores de expressão, são sujeitos, com vantagens, a amplificação e ligação da maneira conhecida. Deve-se proceder, de preferência, de acordo com o protocolo para Pfu DNA polimerase ou mistura de Pfu/Taq DNA polimerase. Os primers (iniciadores) são selecionados de acordo com a sequência a ser amplificada. Vantajosamente, o primer deve ser
- 10 selecionado de forma que o DNA amplificado compreenda toda a sequência codogênica, desde o códon inicial até o códon de parada. Vantajosamente, o DNA amplificado é analisado após a amplificação. A análise pode ser feita, por exemplo, com relação à qualidade e à qualidade após separação eletroforética em gel. O DNA amplificado pode então ser purificado de acordo com um protocolo padrão
- 15 (Qiagen, por exemplo). Uma alíquota do DNA amplificado e purificado fica então disponível para clonagem posterior.

De maneira geral, os especialistas conhecem os vetores de clonagem adequados. Eles incluem, particularmente, vetor replicáveis em sistemas microbianos, ou seja, especialmente vetores que permitem eficiência na clonagem e na expressão em

20 bactérias, leveduras ou fungos e/ou que permitem a formação estável de plantas. Vale a pena mencionar, especialmente, vários sistemas de vetores binários e cointegrados adequados para a transformação de plantas mediada por T-DNA. Esses vetores binários incluem vetores das séries pBIB-HYG, pPZP, pBecks, pGreen. De acordo com a invenção, são preferíveis Bin19, pBI101, pBinAR, pGPTV

25 e pCAMBIA. Uma visão geral dos vetores binários e seu uso é fornecida por Hellens

et al. (2000) Trends in Plant Science 5: 446–451.

Para preparação do vetor, os vetores podem inicialmente ser linearizados por meio de endonuclease(s) de restrição e posteriormente modificados enzimaticamente de qualquer maneira adequada. O vetor é depois purificado e uma alíquota é usada
5 para clonagem. Durante a clonagem o DNA amplificado enzimaticamente cortado e, se necessário, purificado é ligado a fragmentos de vetor preparados da mesma forma por meio de uma ligase. Uma determinada construção de ácido nucleico, de vetor ou de plasmídeo pode ter uma ou até mesmo várias regiões de genes codogênicos. Preferivelmente, as regiões de genes codogênicos nessas construções
10 são ligadas funcionalmente a sequências regulatórias, conforme descrito acima. As construções podem ser construídas com vantagem em micro-organismos, especialmente em *E. coli* e *Agrobacterium tumefaciens*, em meio adequado, e propagados estavelmente sob condições de seleção. As células são então cultivadas e lisadas e o plasmídeo é extraído, permitindo a transferência de DNA
15 heterólogo para micro-organismos ou plantas.

Com o uso vantajoso de vetores de clonagem, os ácidos nucleicos e as construções de ácido nucleico consoante a invenção podem ser inseridos em organismos, tais como micro-organismos ou plantas, e usados para transformação da planta. Os ácidos nucleicos usados no método, os ácidos nucleicos e as construções de ácido
20 nucleico e/ou vetor consoante a invenção podem, portanto, ser utilizados para modificação genética de um amplo espectro de organismos.

Em termos da invenção, o termo “célula transgênica” significa, conforme descrito acima, que os ácidos nucleicos usados no método não estão em seu sítio natural no genoma da célula, de forma que os ácidos nucleicos podem ser expressos em
25 células hospedeiras homólogas ou heterólogas. Contudo, transgênico também

significa que, embora os ácidos nucleicos consoante a invenção estejam localizados em seu sítio natural no genoma de um organismo, isto é, o sítio da 13-HPOL, a sequência foi alterada com relação à sequência natural e/ou as sequências regulatórias das sequências naturais foram modificadas. Preferivelmente, transgênico deve ser interpretado como a expressão dos ácidos nucleicos consoante a invenção em um sítio não-natural do genoma, ou seja, os ácidos nucleicos são expressados de maneira homóloga ou, preferivelmente, heteróloga.

Células hospedeiras para expressão de ácidos nucleicos, cassetes de expressão e vetores da invenção incluem bactérias, leveduras, fungos, células vegetais, plantas, células de insetos e células de mamíferos.

Os organismos hospedeiros preferíveis, consoante a presente invenção, são bactérias tais como as do gênero *Escherichia*, fungos como por exemplo *Mortierella*, *Saprolegnia* ou *Pythium*, leveduras como *Saccharomyces*, cianobactérias, ciliados, algas ou protozoários, como por exemplo os dinoflagelados *Crypthecodinium*. Micro-organismos adequados usados industrialmente incluem, entre outros, bactérias Gram-negativas como *E. coli*, bactérias Gram-positivas como *B. subtilis*, fungos como *A. niger*, *A. nidulans*, *N. crassa*, leveduras como *S. cerevisiae*, *K. lactis*, *H. polymorpha*, *P. pastoris*, *Y. lipolytica*, actinomicetos como *Streptomyces sp.* Vários desses micro-organismos são descritos no “Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology” (editores-chefes: A. L. Demain, J. E. Davies; ASM Press).

Outras células hospedeiras adequadas podem ser deduzidas de: Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Cepas adequadas para expressão, por exemplo com uma menor atividade de protease, são descritas em: Gottesman, S., Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, California

(1990) 119-128.

As células de *E. coli* têm a maior preferência de uso. Cepas adequadas de *E. coli* incluem, por exemplo, MC1061, BL21, JM101, JM105, JM109 e DH5α.

De acordo com a invenção, o termo “planta transgênica” compreende a planta em
5 sua totalidade, assim como todas as partes da planta na qual a expressão das
proteínas de 13-HPOL, consoante a invenção, seja maior. Isto compreende todas as
partes da planta e os órgãos da planta, como folha, haste, semente, raiz, bulbos,
anteras, fibras, ramificações da raiz, caule, embriões, calos, cotilédones, pecíolos,
material produzido, tecidos da planta, tecidos reprodutivos, culturas celulares
10 derivadas da planta transgênica e/ou que podem ser usadas para produzir a planta
transgênica.

As plantas usadas para o método da invenção podem, em princípio, ser qualquer
planta que precise se tornar resistente a uma infestação de patógeno.
Preferivelmente, é uma monocotiledônea ou dicotiledônia como uma planta agrícola,
15 comestível ou para forragem.

Células de mamífero adequadas incluem, por exemplo, células NIH3T3, CHO, COS,
293, Jurkat, BHK e HeLa.

A expressão específica da proteína de 13-HPOL nas células transgênicas consoante
a invenção podem ser comprovadas e rastreadas por meio de métodos moleculares
20 biológicos e bioquímicos comuns. O especialista na área conhece essas técnicas e é
facilmente capaz de selecionar métodos de detecção adequados, como a análise
Northern Blot para detecção de RNA específico de 13-HPOL ou para a determinação
da quantidade de acumulação de RNA específico de 13-HPOL, ou uma análise
Southern Blot, ou PCR, para a detecção de sequências de DNA que codifiquem a
25 13-HPOL. A sonda ou sequências primer usadas para esta finalidade podem ser

idênticas às sequências dadas em ID SEQ No.s 3, 5, 7, 9 11, 13, 15 ou 17 ou podem apresentar ligeiras diferenças com relação a essas sequências.

Se forem usados micro-organismos na presente invenção, esses organismo são preferencialmente cultivados em condições padrão, em um processo de fermentação
5 conhecido do especialista.

O termo “condições padrão” se refere ao cultivo de um micro-organismo em um meio padrão. A temperatura, o pH e o tempo de incubação podem variar, conforme descrito abaixo.

O intervalo de temperatura normalmente deve ser de 15°C a 45°C, mas este pode
10 ser mais alto, de até 105°C, para organismos termofílicos. A temperatura pode ser mantida constante ou ser alterada durante o experimento.

O pH do meio pode estar entre 5 e 8,5, preferivelmente ao redor de 7,0, e pode ser mantido com a adição de tampões ao meio. Um exemplo de tampão para esta finalidade é um tampão de fosfato de potássio. Tampões sintéticos, como MOPS,
15 HEPES, ACES e outros podem sem ser usados como alternativa ou simultaneamente. Também é possível manter um pH constante para a cultura através da adição de um ácido ou uma base, como o ácido acético, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, NaOH, KOH ou NH₄OH durante o crescimento. Se forem utilizados componentes complexos nos meios, como extrato de levedura, pode-se reduzir a
20 necessidade de tampões adicionais, devido ao fato de que muitos compostos complexos apresentam propriedades de tampão. Se for utilizado um fermentador para a cultura dos micro-organismos, o pH também pode ser controlado usando-se amônia gasosa.

O tempo de incubação é geralmente de algumas horas a vários dias. Este tempo é
25 selecionado a fim de permitir o acúmulo da quantidade máxima de produto no caldo.

Os experimentos de crescimento divulgados podem ser realizadas em uma variedade de recipientes, como placas microtiter, tubos de vidro, frascos de vidro ou fermentadores de vidro ou metal de diferentes tamanhos. Para a seleção de um grande número de clones, os micro-organismos devem ser cultivados em placas microtiter, tubos de vidro ou frascos de agitação, com ou sem direcionadores. São usados preferivelmente frascos de agitação de 100 ml ou 250 ml, cheios com cerca de 10% (em volume) do meio de cultura necessário. Os frascos devem ser agitados em um agitador rotativo (amplitude de cerca de 25 mm), utilizando uma faixa de velocidade de cerca de 100-300 rpm. As perdas por evaporação podem ser diminuídas pela manutenção de uma atmosfera úmida; como alternativa, pode ser realizada uma correção matemática para as perdas por evaporação.

Se forem testados clones geneticamente modificados, pode-se testar também um clone de controle não modificado ou contendo o plasmídeo básico, sem nenhuma inserção.

As condições de cultura padrão para cada micro-organismo usado podem ser tomadas a partir dos livros de referência, como Sambrook and Russell, Molecular Cloning – A laboratory manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 3rd edition (2001).

Cepas de *E. coli* e *C. glutamicum*, por exemplo, são rotineiramente cultivadas em caldo MB ou LB e BHI (Follettie, M. T. et al. (1993) J. Bacteriol. 175: 4096-4103, Difco Becton Dickinson). Os meios padrão mínimos usuais para *E. coli* são M9 e MCGC modificado (Yoshihama et al. (1985) J. Bacteriol. 162: 591-507; Liebl et al. (1989) Appl. Microbiol. Biotechnol. 32: 205-210.). Outros meios padrão adequados para o cultivo de bactérias incluem NZCYM, SOB, TB, CG12 ½ e YT.

“Meios padrão”, na acepção da presente invenção, devem incluir todos os meios

adequados para o cultivo de micro-organismos da presente invenção, incluindo meios enriquecidos e mínimos.

“Meios mínimos” são meios que contêm apenas as necessidades mínimas para o crescimento de células originais, isto é, sais inorgânicos, uma fonte de carbono e
5 água.

Em contraste, "meios enriquecidos" são concebidos para satisfazer a todos os requisitos de crescimento de um micro-organismo específico, ou seja, para além do conteúdo dos meios mínimos que contêm, como por exemplo fatores de crescimento.

- 10 Podem ser adicionados antibióticos ao meio padrão nas seguintes quantidades (microgramas por mililitro): ampicilina, 50; canamicina, 25; ácido nalidíxico, 25, para permitir a seleção das cepas transformadas.

Meios adequados consistem em uma ou mais fontes de carbono, fontes de nitrogênio, sais inorgânicos, vitaminas e oligoelementos. Fontes de carbono
15 preferenciais são açúcares, como os mono-, di-ou polissacarídeos. Por exemplo, a glicose, frutose, manose, galactose, ribose, sorbose, lactose, maltose, sacarose, rafinose, amido ou celulose podem servir como fontes muito boas de carbono.

Também é possível o fornecimento de açúcar para o meio através de compostos complexos, tais como melaço ou outros subprodutos do refino de açúcar. Também
20 pode ser vantajoso o fornecimento de misturas de diferentes fontes de carbono. Outras possíveis fontes de carbono são álcoois e ácidos orgânicos, como metanol, etanol, ácido acético ou ácido láctico. Fontes de nitrogênio são normalmente compostos nitrogenados orgânicos ou inorgânicos ou materiais que contenham estes compostos. Exemplos de fontes de nitrogênio incluem gás ou sais de amônia,
25 como NH_4Cl ou $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4OH , nitratos, ureia, aminoácidos ou fontes complexas

de nitrogênio como licor de milho, farinha de soja, proteína de soja, extrato de levedura, extrato de carne e outros.

Compostos de sais inorgânicos que podem ser incluídos nos meios incluem os sais de cloreto, fosfato ou sulfato de cálcio, magnésio, sódio, cobalto, molibdênio, 5 potássio, manganês, zinco, cobre e ferro. Compostos quelantes podem ser adicionados ao meio para manter os íons metálicos em solução. Compostos quelantes particularmente úteis incluem dihidroxifenóis, como catecol ou protocatecoato, ou ácidos orgânicos, como o ácido cítrico. É comum os meios também conterem outros fatores de crescimento, como vitaminas ou promotores de 10 crescimento, que incluem por exemplo biotina, riboflavina, tiamina, ácido fólico, ácido nicotínico, pantotenato e piridoxina. Os fatores de crescimento e de sais frequentemente provêm de componentes complexos de meios, como extrato de levedura, melaço, licor de milho e outros. A composição exata dos compostos dos meios depende fortemente do experimento imediato e é decidida individualmente 15 para cada caso específico. Informações sobre otimização dos meios podem ser obtidas no livro de referência Applied Microbiol. Physiology, A Practical Approach (eds. P. M. Rhodes, P.F. Stanbury, IRL Press (1997) pp. 53-73, ISBN 0 19 963577 3). Também é possível selecionar meios de cultura de fornecedores comerciais, como padrão 1 (Merck) ou BHI (brain heart infusion, 20 DIFCO) ou outros.

Além disso, também pode ser vantajoso adicionar o ácido delta-aminolevulínico precursor do heme ao meio, a fim de melhorar a eficácia da expressão da liase recombinante ativa.

Todos os componentes do meio devem ser esterilizados, por calor (20 minutos a 25 1,5 bar e 121°C) ou por filtração estéril. Os componentes podem ser esterilizados

em conjunto ou, se necessário, em separado.

A preparação dos meios padrão usados para o cultivo de bactérias normalmente não envolve a adição de aminoácidos simples. Em vez disso, é adicionada uma mistura de aminoácidos como peptona ou triptona ao meio enriquecido para uso nas
5 condições de cultura padrão.

As células transgênicas consoante a presente invenção podem ser cultivadas de qualquer forma adequada, por exemplo, através do cultivo em lote ou do cultivo com alimentação em lote.

“Cultivo em lote”, na acepção da presente invenção, é um método de cultivo no qual
10 não é acrescentado nem retirado meio de cultura durante o cultivo.

“Cultivo com alimentação em lote”, na acepção da presente invenção, é um método de cultivo no qual é adicionado meio de cultura durante o cultivo, mas não há retirada de meio de cultura.

A expressão de proteínas em procariontes geralmente é realizada com vetores
15 contendo vetores constitutivos ou indutíveis direcionando a expressão de proteínas de fusão e não-fusão.

Vetores de fusão adicionam vários aminoácidos a uma proteína codificada pela sequência de ácido nucleico inserida, geralmente na terminação amino da proteína recombinante, mas também na terminação C ou fundida com regiões adequadas
20 nas proteínas. Esses vetores de fusão, de modo geral, servem a três finalidades:

- 1) aumentar a expressão da proteína recombinante;
- 2) aumentar a solubilidade da proteína recombinante e
- 3) ajudar na purificação da proteína recombinante através de um ligante para a purificação por afinidade.

25 Muitas vezes, em vetores de expressão de fusão, um sítio de clivagem proteolítica é

introduzido na junção da porção de fusão e da proteína recombinante para permitir a separação da proteína recombinante da porção de fusão após a purificação da proteína de fusão. Essas enzimas, e suas sequências de reconhecimento cognato, incluem fator Xa, trombina e enteroquinase.

- 5 Vetores de expressão de fusão comuns incluem pQE (Qiagen), pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith, D. B. and Johnson, K. S. (1988) Gene 67: 31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) e pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ), que fundem glutathione S-transferase (GST), proteína de ligação da maltose E ou proteína A, respectivamente, à proteína recombinante.
- 10 Exemplos de vetores para *C. glutamicum* podem ser encontrados no Handbook of Corynebacterium 2005 Eggeling, L. Bott, M., eds., CRC press, EUA).
Exemplos de vetores de expressão de não-fusão indutíveis adequados para *E. coli* incluem pTrc (Amann et al. (1988) Gene 69: 301-315), pLG338, pACYC184, pBR322, pUC18, pUC19, pKC30, pRep4, pHSI, pHS2, pPLc236, pMBL24, pLG200,
15 pUR290, pIN-III113-BI, egtII, pBdCI e pET lld (Studier et al., Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 60-89; Pouwels et al., eds. (1985) Cloning Vectors. Elsevier: New York ISBN 0 444 904018). A expressão do gene-alvo a partir do vetor pTrc se baseia na transcrição da polimerase do RNA do hospedeiro a partir de um promotor de fusão
20 trp-lac híbrido. A expressão do gene-alvo a partir do vetor pET lld se baseia na transcrição de um promotor de fusão T7 gnlO-lac mediada por uma polimerase de RNA viral coexpressa (T7 gnl). Esta polimerase viral é fornecida pelas cepas BL21 (DE3) ou HMS174 (DE3) do hospedeiro a partir de um profago X residente abrigando um gene T7 gnl sob o controle de transcrição do promotor lacUV 5. Para a
25 transformação de outras variedades de bactérias, podem ser escolhidos vetores

apropriados. Por exemplo, sabe-se que os plasmídeos pIJ101, pIJ364, pIJ702 e pIJ361 são úteis na transformação de *Streptomyces*, enquanto plasmídeos pUB110, pC194 ou pBD214 são adequados para a transformação das espécies *Bacillus*. Vários plasmídeos de uso na transferência de informação genética em

5 *Corynebacterium* incluem pHM1519, pBLI, pSA77 ou pAJ667 (Pouwels et al., eds. (1985) Cloning Vectors. Elsevier: New York ISBN 0 444 904018).

Em outra forma de execução, o vetor de expressão da proteína é um vetor de expressão de levedura. Exemplos de vetores para expressão em levedura (*S. cerevisiae*) incluem pYepSecI (Baldari, et al. (1987) Embo J. 6: 229-234), 2i, pAG-1,

10 Yep6, YepI3, pEMBLYe23, pMFa (Kurjan and Herskowitz (1982) Cell 30: 933-943), pJRY88 (Schultz et al. (1987) Gene 54: 113-123) e pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA). Vetores e métodos para a construção de vetores apropriados para uso em outros fungos, como os fungos filamentosos, incluem aqueles detalhados em: van den Hondel, C. A. M. J. J. & Punt, P. J. (1991) em: Applied Molecular

15 Genetics of Fungi, J. F. Peberdy, et al., eds., p. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge, and Pouwels et al., eds. (1985) Cloning Vectors. Elsevier: New York (ISBN 0 444 904018).

O DNA do vetor pode ser introduzido em células procarióticas através de técnicas de transformação convencionais ou de transfecção. Da forma como são usados neste

20 documento, os termos “transformação” e “transfecção”, “conjugação” e “transdução” referem-se a uma variedade de técnicas reconhecidas na área para introdução de ácido nucleico estranho, como DNA ou RNA linear, por exemplo (um vetor linearizado ou uma construção de gene sozinha, sem vetor) ou ácido nucleico na forma de um vetor (um plasmídeo, fago, fasmídeo, fagomídeo, transpóson ou outro

25 DNA) em uma célula hospedeira, incluindo coprecipitação de fosfato de cálcio ou

cloreto de cálcio, transfecção de DEAE mediada por dextrana, lipofecção, competência natural, transferência com mediação química ou eletroporação. Métodos adequados para a transformação ou transfecção de células do hospedeiro podem ser encontrados em Sambrook, et al. (Molecular Cloning: A Laboratory
5 Manual. 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2003) e em outros manuais de laboratório.

A fim de identificar e selecionar os integrantes, um gene que codifica um marcador selecionável (por exemplo, a resistência a antibióticos) é geralmente introduzido na célula hospedeira juntamente com o gene de interesse. Os marcadores
10 selecionáveis preferíveis incluem aqueles que conferem resistência a medicamentos, tais como, entre outros, G418, higromicina, canamicina, tetraciclina, neomicina, ampicilina (e outras penicilinas), cefalosporinas, fluoroquinonas, ácido naladixico, cloranfenicol, espectinomicina, eritromicina, estreptomicina e metotrexato. Outros marcadores selecionáveis incluem genes originais que podem
15 complementar as versões mutantes do gene equivalente em um hospedeiro ou cepa inicial. Por exemplo, um gene essencial para o crescimento em um meio mínimo, tal como *serA*, pode ser transformado ou excluído do genoma de uma cepa inicial ou hospedeira de *C. glutamicum* da invenção, conforme descrita anteriormente neste documento, para criar um auxotrofo de serina. Em seguida, um vetor contendo um
20 gene *serA* original ou outra cópia funcional do gene *serA* pode ser usado para selecionar transformantes ou integrantes. Um ácido nucleico que codifica um marcador selecionável pode ser introduzido em uma célula hospedeira no mesmo vetor que o que codifica sequências de ácido nucleico modificadas mencionadas anteriormente ou pode ser introduzido em um vetor separado. Células estavelmente
25 transfectadas com o ácido nucleico introduzido podem ser identificadas através da

seleção por medicamentos (por exemplo, as células que incorporaram o gene marcador selecionável sobreviverão, enquanto as outras células morrem).

Quando são usados plasmídeos sem uma origem de replicação e dois genes marcadores diferentes, também é possível gerar cepas sem marcadores, que
5 contêm parte da inserção do genoma. Isto é conseguido por dois eventos consecutivos de recombinação homóloga (ver também Becker et al. (2005) Appl. Environ. Microbiol. 71 (12): 8587–8596).

Em outra forma de execução, podem ser produzidos micro-organismos recombinantes que contêm sistemas de seleção que permitem a expressão regulada
10 do gene introduzido. Por exemplo, a inclusão de uma das sequências de ácido nucleico supramencionadas em um vetor, colocando-o sob controle do operon lac permite a expressão do gene apenas na presença de IPTG. Tais sistemas regulatórios são bem conhecidos na área.

Existem muitas técnicas conhecidas disponíveis para a inserção de DNA em uma
15 célula da planta hospedeira, e o especialista na área não terá dificuldade em encontrar o método mais adequado em cada caso. Estas técnicas incluem a transformação de células vegetais com a T-DNA, usando *Agrobacterium tumefaciens* e *Agrobacterium rhizogenes* como agentes de transformação, a fusão de protoplastos, a transferência direta de genes do DNA isolado em protoplastos, a
20 eletroporação de DNA, a inserção do DNA por meio da método biolístico, bem como outras possibilidades. Transformantes estáveis e provisórios podem ser gerados desta maneira.

Naturalmente, as células da planta que contêm as moléculas de ácido nucleico consoante a invenção podem ainda ser cultivadas sob a forma de uma cultura de
25 células (incluindo protoplastos, calos, culturas de suspensão e similares).

Além de utilizar organismos ou células transgênicos, tais como bactérias, leveduras, insetos, células de mamíferos ou plantas e fungos ou algas, as enzimas 13-HPOL da presente invenção também podem ser expressas em sistema sem células, usando um vetor de expressão adequado. A expressão sem células é uma reação conjunta
5 de transcrição e tradução para produzir a proteína recombinante ativa em quantidades elevadas *in vitro* e que pode ser obtida comercialmente.

A presente invenção também diz respeito a um método para preparação de um polipeptídeo de 13-hidroperóxido liase modificado da presente invenção, cultivando uma ou mais células transgênicas consoante a presente invenção, em condições
10 que permitam a expressão do polipeptídeo e, opcionalmente, sua recuperação.

O termo “cultura de células” significa que as células são cultivadas em condições que permitem a proliferação das células e a expressão do polipeptídeo. Essas condições incluem o meio contendo componentes que são necessários para o metabolismo das células, a temperatura, o pH e o tempo de incubação, conforme
15 discutido anteriormente.

O polipeptídeo pode ser recuperado por qualquer método de purificação conhecido na área, como por exemplo filtração em gel ou métodos cromatográficos. Preferencialmente, a proteína é expressa como uma proteína de fusão com um número de aminoácidos que constituem um ligante para a purificação por afinidade,
20 como a glutathione S-transferase, proteína ligada a maltose ou proteína A. Como discutido acima, estes ligantes podem ser removidos após a purificação tratando-se a proteína de fusão com uma protease.

A presente invenção diz respeito, ainda, ao uso da 13-hidroperóxido liase modificada da presente invenção para clivagem de um 13-hidroperóxido de um ácido graxo poli-
25 insaturado em um aldeído e um ácido oxocarboxílico.

O termo “ácidos graxos poli-insaturados” refere-se aos ácidos graxos com pelo menos duas ligações duplas.

“Hidroperóxidos de ácido graxo” são formados pela oxidação dos ácidos graxos insaturados. Em particular, 13-hidroperóxidos são formados pela oxidação dos ácidos graxos insaturados no átomo de carbono 13. Se for usado ácido linoleico ou ácido linolênico com 18 átomos de carbono como o ácido graxo poli-insaturado no método da presente invenção, a ação da 13-hidroperóxido liase da presente invenção acarreta na produção de um aldeído C₆ e de um ácido oxocarboxílico C₁₂.

Por exemplo, n-hexanal é produzido a partir do 13-hidroperóxido do ácido linoleico e 3-(Z)-hexen-1-al é produzido a partir do 13-hidroperóxido do ácido alfa-linolênico.

Mais particularmente, o produto da reação obtido pela clivagem de 13-hidroperóxidos de hidrolisado de óleo de linhaça (mistura de 13-hidroperóxidos de ácido linoleico e ácido linolênico), pela 13-hidroperóxido liase da invenção é uma mistura de n-hexanal, 3-(Z)-hexen-1-al e 2-(E)-hexen-1-al.

Os aldeídos C₆ produzidos podem então ser usados como ingredientes de sabor e/ou fragrância ou reagido posteriormente para gerar outros produtos, como os álcoois correspondentes. Os produtos desejados obtidos podem ser separados do meio de reação por meio de destilação a vapor e/ou extração com um solvente orgânico inerte.

Portanto, a presente invenção diz respeito a um método de produção de um aldeído, compreendendo as etapas de:

- a) contato de um 13-hidroperóxido de um ácido graxo poli-insaturado com a 13-hidroperóxido liase modificada da presente invenção; e
- b) recuperação do aldeído produzido.

Preferivelmente, este método também compreende, antes da etapa a), a etapa de

fornecimento de uma 13-hidroperóxido liase modificada da presente invenção.

Preferivelmente, a presente invenção diz respeito a um método de produção de uma mistura de n-hexanal, 3-(Z)-hexen-1-al e 2-(E)-hexen-1-al, compreendendo as etapas de:

- 5 a) contato de um 13-hidroperóxido de hidrolisado de óleo de linhaça com a 13-hidroperóxido liase modificada da invenção; e
- b) Recuperação da mistura de hexanal, 3-(Z)-hexen-1-al e 2-(E)-hexen-1-al produzida na etapa a).

Mais preferivelmente, este método também compreende, antes da etapa a), a etapa

- 10 de fornecimento de uma 13-hidroperóxido liase modificada da presente invenção.

A 13-hidroperóxido liase da presente invenção pode ser fornecida de diferentes formas.

Primeiro, as células microbianas recombinantes (de *E. coli*, por exemplo) podem ser lisadas, por exemplo, por sonificação, choque osmótico, ciclos de congelamento e

- 15 descongelamento ou pela utilização de kits de lise celular (por exemplo, CellLytic™ da Sigma) e, em seguida, o lisado obtido pode ser diretamente adicionado a uma solução de hidroperóxidos de ácidos graxos para formar o aldeído e o ácido oxocarboxílico.

Em segundo lugar, os hidroperóxidos podem ser produzidos *in vivo* em uma célula

- 20 transgênica ou organismo transgênico, como células microbianas, plantas, culturas de células vegetais, fungos, células de mamíferos, células do inseto e cianobactérias.

Em terceiro lugar, a 13-HPOL pode ser purificada a partir do organismo transgênico.

Preferencialmente, a sequência de nucleotídeos que codifica para a 13-HPOL é

- 25 clonada em um vetor que contém uma sequência de nucleotídeos que codifica para

uma tag de afinidade, como proteína de ligação com celulose, proteína de ligação com maltose, glutathione S-transferase ou uma tag His. Após a transcrição e tradução do DNA é formada uma proteína de fusão, que pode então ser facilmente purificada através de cromatografia de afinidade. Vetores e métodos úteis para a produção e

5 purificação da proteína de fusão são bem conhecidos por especialistas na área. Após a purificação, a tag de afinidade pode ser removida pela ação de uma protease, tal como Fator X. No entanto, essas tags de afinidade proporcionam o aumento da atividade da proteína de fusão recombinante devido melhor duplicação/solubilidade da proteína, etc. Essas e outras tags também permitem a

10 imobilização da proteína de fusão em matrizes baratas como amilose e celulose, que podem ser usadas em reatores para a estabilização e reciclagem da enzima recombinante.

O termo “contato” significa que a enzima 13-hidroperóxido liase e seu substrato, o 13-hidroperóxido de um ácido graxo poli-insaturado, são reunidos sob condições de

15 reação adequadas para permitir a reação. O perito sabe que as condições de reação têm de ser selecionadas para que a reação ocorra. Outros exemplos para essas condições de reação são fornecidos nos exemplos abaixo.

O aldeído produzido pode ser recuperado por qualquer método conhecido do especialista, por exemplo, através da destilação a vapor e/ou extração com um

20 solvente orgânico inerte. Os produtos de reação podem então ser analisados por meio de cromatografia gasosa ou HPLC.

O substrato para a 13-hidroperóxido liase, ou seja, 13-hidroperóxido de um ácido graxo poli-insaturado, pode ser produzido pela atividade de uma 13-lipoxigenase. Oxigenases catalisam a dioxigenação específica por estereo e região de ácidos

25 graxos poli-insaturados que contenham pelo menos um sistema de 1-(Z),4-(Z)-

pentadieno, por exemplo, ácido linoleico, ácido linolênico e ácido araquidônico. A 13-lipoxigenase apresenta uma especificidade para a posição C₁₃ do ácido graxo, ou seja, ela oxigena preferencialmente no átomo de carbono 13 do backbone de hidrocarboneto do ácido graxo, gerando 13-hidroperóxidos do ácido graxo.

5 A 13-lipoxigenase pode ser fornecida sob a forma de grãos de soja homogeneizados, que são a fonte mais barata de 13-lipoxigenase (ver, por exemplo, US 5,464,761; US 6,780,621). Outra maneira de fornecer a 13-lipoxigenase é expressão recombinante. A sequência de aminoácidos e nucleotídeos de uma lipoxigenase procariótica com especificidade para C₁₃ é informada em
10 EP 06123710.3 e em Lang and Feussner (2007) *Phytochemistry* 68(8): 1120-1127, assim como em Koeduka et al. (2007) *Curr. Microbiol.* 54(4): 315-319. A 13-lipoxigenase recombinante pode ser produzida na mesma célula que as 13-hidroperóxido liase ou pode ser produzida em uma célula separada. Se for produzida dentro da mesma célula, os aldeídos correspondentes podem ser produzidos a partir
15 dos hidroperóxidos, imediatamente após estes serem formados. A 13-lipoxigenase pode ser usada na forma de um lisado celular, de uma suspensão de células ou de uma proteína purificada, conforme descrito acima para a 13-hidroperóxido liase.

Os aldeídos produzidos pelo método da presente invenção podem ser reduzidos a seus álcoois correspondentes por diversos meios, por exemplo, adicionando
20 fermento de pão fresco à solução de reação. O fermento contém uma enzima desidrogenase ativa para álcool, que reduz o aldeído. Como alternativa, podem ser utilizados álcool desidrogenases isoladas ou agentes químicos como KBH₄ ou NaBH₄ para a redução do aldeído ao álcool correspondente.

O isolamento das 13-hidroperóxido liases variantes da presente invenção, assim
25 como sua caracterização, são descritos abaixo nos exemplos. Os exemplos a seguir

não devem ser interpretados como uma restrição. O conteúdo de toda a literatura, pedidos de patentes, patentes e pedidos de patentes publicados citados no presente pedido de patente são aqui incorporados para referência.

Exemplos

5

Exemplo 1

Evolução molecular de 13-hidroperóxido liase de goiaba original

As 13-hidroperóxido liases da presente invenção foram obtidas por várias rodadas de mutagênese e shuffling do DNA que codifica para a 13-hidroperóxido liase goiaba, de acordo com ID SEQ No. 1 e sequências adicionais de DNA que codificam para uma 9-hidroperóxido liase de *C. melo* e sequências de DNA que codificam para 13-hidroperóxido liases de *C. sinensis* e *N. attenuata*. As etapas de mutagênese foram realizadas submetendo o DNA ao método EvoSight™, conforme descrito em WO 2006/003298. As etapas de shuffling foram realizadas submetendo o DNA ao método L-Shuffling™, conforme descrito em WO 00/09679. DNA que codifica para a 13-hidroperóxido liase de goiaba, de acordo com ID SEQ No. 1, foi fragmentado, misturado com o DNA fragmentado adicional que codifica para uma 9- ou 13-hidroperóxido liase de *C. melo*, *C. sinensis* e *N. attenuata* e remontado através de passos recursivos de desnaturação/hibridação em uma matriz/ligação. Foi realizada a seleção de alto rendimento das proteínas mutantes em cada rodada de evolução molecular, monitorando-se o consumo de substrato a 234 nm. As variantes aprimoradas identificadas foram validadas por análise cromatográfica do substrato e dos produtos.

Exemplo 2

Clonagem de 13-hidroperóxido liases modificadas em vetores de expressão apropriados

25

As sequências de nucleotídeos que codificam para as 13-hidroperóxido liases modificadas GC7, E8B, AC5, C2A, B7A, D10A, E8B e 9D3, conforme ilustrado no ID SEQ nos. 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 e 17, respectivamente , foram clonados no vetor pMAL-c2X (New England Biolabs) usando um linker de 5' contendo um sítio *EcoRI* e um linker de 3' contendo um sítio *BamHI*. A lista dos diferentes plasmídeos obtidos é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1: Exemplos de plasmídeos recombinantes

Plasmídeo	Descrição
pB7#A	<i>EcoRI</i> - <i>BamHI</i> fragmento B7#A em pMAL-c2X
pAC#5	<i>EcoRI</i> - <i>BamHI</i> fragmento AC#5 em pMAL-c2X
pC2#A	<i>EcoRI</i> - <i>BamHI</i> fragmento C2#A em pMAL-c2X
pE8#B	<i>EcoRI</i> - <i>BamHI</i> fragmento E8#B em pMAL-c2X
pGC#7	<i>EcoRI</i> - <i>BamHI</i> fragmento GC#7 em pMAL-c2X
pD10#A	<i>EcoRI</i> - <i>BamHI</i> fragmento D10#A em pMAL-c2X
p4E#10	<i>EcoRI</i> - <i>BamHI</i> fragmento 4E#10 em pMAL-c2X
p9D#3	<i>EcoRI</i> - <i>BamHI</i> fragmento 9D#3 em pMAL-c2X
pWT	<i>EcoRI</i> - <i>BamHI</i> fragmento de DNA que codifica para a proteína de ID SEQ no. 1 com uma inserção na terminação N composta pelos aminoácidos ATPSSSSPE

Exemplo 3

Clivagem de hidroperóxido de ácido graxo pelas 13-hidroperóxido liases modificadas, em comparação com a enzima “original”

Experimento 1

Foram cultivadas células MC1061 de *E. coli* transformadas com os plasmídeos pB7#A, pAC#5, pC2#A, pE8#B, pGC#7, p4E#10, p9D#3, pD10#A e pWT da tabela 1, em frascos de agitação com 25 ml de meio LB com 100 ppm de ampicilina, a 180 rpm a 20°C por 30 horas, sem indução. As culturas foram centrifugadas e o sedimento ressuspense em tampão de fosfato 100 mM com pH 7,6 e ajustadas para uma densidade óptica de OD₆₀₀=10 para todas as células transformadas, exceto

aqueles transformadas com o plasmídeo pD10#A, para o qual a densidade óptica foi ajustada para $OD_{600}=25$. A atividade catalíticas das variantes da enzima 13-HPOL foi determinada conforme segue: 100 μ l (10% v/v) de suspensão celular ($OD_{600}=10$, respectivamente $OD_{600}=25$) foram adicionados a 900 μ l de uma solução contendo

5 84,3 g/kg de hidroperóxidos de ácido graxo (incluindo cerca de 75% da 13-HPOT do substrato) previamente produzida com hidrolisado de óleo de linhaça como fonte de ácidos graxos e grãos de soja triturados como fonte de 13-lipoxigenase. Foram adicionados sob agitação 20 mg de álcool desidrogenase de fígado de cavalo, como agente redutor, e 330 mg de NADH. A reação foi realizada em temperatura ambiente

10 por 2 minutos. Uma alíquota de 100 μ l da mistura de reação foi diluída com 900 μ l de água, extraída com um volume de acetato de etila e analisada por cromatografia gasosa para verificação da presença de 3-(Z)-hexen-1-ol. O consumo dos hidroperóxidos de ácidos graxos foi acompanhado por HPLC. O rendimento molar é expresso como a razão entre a quantidade de 3-(Z)-hexen-1-ol obtida durante a

15 reação e a quantidade de 3-(Z)-hexen-1-ol que se poderia, teoricamente, obter a partir da quantidade de 13-HPOT presente na reação.

Os resultados deste experimento estão listados na Tabela 2, mostrando a melhora na atividade enzimática das liases modificadas em relação à enzima recombinante original (pWT).

20 **Tabela 2:** Atividade das hidroperóxido liases modificadas

Foram utilizados álcool desidrogenase de fígado de cavalo e NADH como agentes redutores.

Plasmídeo	Concentração do biocatalisador	3-(Z)-hexen-1-ol		Conversão de 13-HPOT (%)
		(g l ⁻¹)	Rendim ento molar	

	(OD ₆₀₀)		(%)	
pB7#A	1	4,6	31	38
pAC#5	1	4,0	27	38
pC2#A	1	5,3	35	43
pE8#B	1	4,8	32	44
pGC#7	1	4,3	29	46
p4E#10	1	3,9	26	40
p9D#3	1	3,8	25	38
pD10#A	2,5	2,8	18,7	58
pWT	1	0,2	1,3	< 10*

* dentro da margem de erro analítica

Experimento 2

Foram cultivadas células MC1061 de *E. coli* contendo os plasmídeos pB7#A, pAC#5, pC2#A, pE8#B, pGC#7, p4E#10, pD10#A, p9D3 e pWT da tabela 1, em frascos de

5 agitação com 25 ml de meio LB contendo 100 ppm de ampicilina, a 180 rpm e a 20°C por 30 horas, sem indução. As culturas foram centrifugadas e o sedimento ressuspensão em tampão de fosfato 100 mM com pH 7,6. A densidade celular foi ajustada para uma densidade óptica de OD₆₀₀=20 para todas as células transformadas, exceto aquelas transformadas com o plasmídeo pD10#A, para o qual

10 a densidade óptica foi ajustada para OD₆₀₀=10. A atividade catalítica foi determinada conforme segue: 100 µl (10% v/v) de suspensão celular (OD₆₀₀=20, respectivamente OD₆₀₀=10) foram adicionados a 900 µl de uma solução contendo 84,3 g/kg de hidroperóxidos de ácido graxo (incluindo cerca de 75% da 13-HPOT do substrato) previamente produzida com hidrolisado de óleo de linhaça como fonte de ácidos

15 graxos e grãos de soja triturados como fonte de 13-lipoxigenase. A reação foi realizada em temperatura ambiente por 5 minutos. Uma alíquota de 100 µl da reação foi diluída em 900 µl de água contendo 2-3 mg do agente redutor NaBH₄ e agitada por 10 minutos. A mistura de reação reduzida foi extraída com um volume de acetato de etila e analisada por cromatografia gasosa para verificação da presença de 3-(Z)-

20 hexen-1-ol. O consumo dos hidroperóxidos de ácidos graxos foi acompanhado por

HPLC. O rendimento molar é expresso como a razão entre a quantidade de 3-(Z)-hexen-1-ol obtida durante a reação e a quantidade de 3-(Z)-hexen-1-ol que se poderia, teoricamente, obter a partir da quantidade de 13-HPOT presente na reação.

Os resultados deste experimento estão listados na Tabela 3, mostrando a melhora na atividade enzimática das liases modificadas em relação à enzima recombinante original (pWT).

Tabela 3: Atividade das hidropéroxido liases modificadas

NaBH₄ foi utilizado como agente redutor.

Plasmídeo	Concentração do biocatalisador (OD ₆₀₀)	3-(Z)-hexen-1-ol		Conversão de 13-HPOT (%)
		(g l ⁻¹)	Rendimento molar (%)	
pB7#A	2	7,4	49	59
pAC#5	2	7,9	53	54
pC2#A	2	9,7	65	55
pE8#B	2	8,8	59	65
pGC#7	2	8,5	57	66
p4E#10	2	6,4	43	54
p9D#3	2	5,4	36	55
pD10#A	1	0,9	6	N/D*
pWT	2	0,8	5	29

* Não há dados

10 Experimento 3

Foram cultivadas células MC1061 de *E. coli* transformadas com os plasmídeos pB7#A, pAC#5, pC2#A, pE8#B, pGC#7, pD10#A e pWT da tabela 1, em frascos de agitação com 100 ml de meio LB com 100 ppm de ampicilina, a 180 rpm e a 20°C por 30 horas, sem indução. As culturas foram centrifugadas, o sedimento foi ressuspenso em tampão de fosfato 100 mM com pH 7,6 e a densidade óptica foi ajustada para OD₆₀₀=10. A atividade catalítica foi determinada conforme segue: 500 mg de fermento de pão seco foram adicionados a 800 µl de tampão de

fosfato 100 mM com pH 7,6 e agitados por 30 segundos. Foram adicionados 3,7 ml de uma solução contendo 83 g/kg de hidroperóxidos de ácido graxo previamente produzidos (incluindo cerca de 75% do 13-HPOT do substrato) com hidrolisado de óleo de linhaça como fonte de ácidos graxos e grãos de soja triturados como fonte de 13-lipoxigenase. 500 µl (10% v/v) de células recombinantes de *E. coli* (OD₆₀₀=10) contendo o plasmídeo de interesse foram então rapidamente adicionados sob agitação. A reação foi mantida em temperatura ambiente por 1 hora. Uma alíquota de 100 µl da reação foi diluída com 900 µl de água, extraída com 1 ml de acetato de etila e analisada por cromatografia gasosa para verificação da presença de 3-(Z)-hexen-1-ol.

Os resultados deste experimento estão listados na Tabela 4, mostrando a melhora na atividade enzimática das liases modificadas da presente invenção em relação à enzima recombinante original (pWT).

Tabela 4: Atividade das hidroperóxido liases modificadas

15 Fermento de pão serviu como agente redutor.

Plasmídeo	Concentração do biocatalisador (OD ₆₀₀)	3-(Z)-hexen-1-ol (g l ⁻¹)
pB7#A	1	1,2
pAC#5	1	1,2
pC2#A	1	1,5
pE8#B	1	1,1
pGC#7	1	2,4
pD10#A	1	0,5
pWT	1	0,2

Experimento 4

Foram cultivadas células MC1061 de *E. coli* contendo os plasmídeos pGC#7, p9D#3, pD10#A e pWT da tabela 1, em frascos de agitação com 25 ml de meio LB contendo 100 ppm de ampicilina, a 180 rpm e a 20°C por 30 horas, sem indução. As culturas foram centrifugadas e o sedimento foi ressuspensão em tampão de fosfato

100 mM com pH 7,6. Foram preparadas suspensões celulares com densidades ópticas variando entre $OD_{600}=20$ e $OD_{600}=250$. A atividade catalítica foi determinada conforme segue: 100 μ l (10% v/v) de suspensão celular ($OD_{600}=20$ a $OD_{600}=250$) foram adicionados a 900 μ l de uma solução contendo 84,3 g/kg de hidroperóxidos de ácido graxo previamente produzida com hidrolisado de óleo de linhaça como fonte de ácidos graxos e grãos de soja triturados como fonte de 13-lipoxigenase. A reação foi realizada em temperatura ambiente por 5 minutos. Uma alíquota de 10 μ l da reação foi diluída em 990 μ l de etanol e o consumo de 13HPOT foi avaliado através de análise por HPLC. Os resultados deste experimento são apresentados na figura

2. Este experimento confirma que as 13-hidroperóxido liases modificadas da presente invenção causaram uma conversão de 100% do ácido 13-hidroperoxioctadecatienoico do substrato, enquanto a 13-hidroperóxido liase de goiaba original converte apenas cerca de 30% do mesmo substrato, mesmo com OD_{600} de 25.

Exemplo 4

Desempenho da 13-hidroperóxido liase modificada GC#7

Experimento 1

Células de *E. coli* MC1061:pGC#7 foram cultivadas a 20°C em 2 litros de meio LB contendo 100 ppm de ampicilina em um reator agitado de escala laboratorial por 30 horas. A cultura foi aerada com ar a 1 vvm. As células foram colhidas por centrifugação e ressuspensas em tampão de fosfato 100 mM com pH 7,6 para produzir uma densidade óptica de $OD_{600}=68$. Os hidroperóxidos de ácido graxo foram produzidos com hidrolisado de óleo de linhaça como fonte de ácidos graxos e grãos de soja triturados como fonte de 13-lipoxigenase. 172 ml de células recombinantes de *E. coli* MC1061:pGC#7 ($OD_{600}=68$) foram adicionados a 1544 g de

solução de hidroperóxido de ácido graxo contendo 87 g/kg de HPOT/D, sob agitação e à temperatura ambiente. A reação foi interrompida após 5 minutos adicionando-se 50 ml de uma solução aquosa contendo 36% do agente redutor NaBH₄. 3-(Z)-hexen-1-ol foi posteriormente isolado por destilação sob pressão reduzida, produzindo 8,7 gramas de 3-(Z)-hexen-1-ol.

Experimento 2

Células de *E. coli* MC1061:pGC#7 foram cultivadas a 30°C, usando meio de sal mineral contendo 100 ppm de ampicilina. O pH foi mantido em 7 e a cultura foi aerada com ar a 1 vvm. A expressão do gene foi induzida pela adição de 0,5 mM de IPTG a uma OD₆₀₀=4. Após 24 horas obteve-se uma densidade óptica de OD₆₀₀=9. As células foram colhidas por centrifugação e ressuspensas em tampão de fosfato 100 mM com pH 7,6 para produzir uma densidade óptica de OD₆₀₀=10. 100 µl (10% v/v) desta suspensão celular foram adicionados a 900 µl de uma solução contendo 83 g/kg de hidroperóxidos de ácido graxo previamente produzida com hidrolisado de óleo de linhaça como fonte de ácidos graxos e grãos de soja triturados como fonte de 13-lipoxigenase. A reação foi realizada em temperatura ambiente por 5 minutos. Uma alíquota de 100 µl da reação foi diluída em 900 µl de água contendo 2-3 mg do agente redutor NaBH₄. A mistura de reação reduzida foi extraída com um volume de acetato de etila e analisada por cromatografia gasosa para verificação da presença de álcoois C₆. Estimou-se que o recombinante MC1061:pGC7 produza uma concentração de 9,5 g/l de 3-(Z)-hexen-1-ol em uma reação, conforme descrito anteriormente.

Breve descrição dos desenhos

A Figura 1 mostra um alinhamento de sequências de aminoácidos de 13-hidroperóxido liases modificadas designadas como GC7, E8B, B7A, C2A, AC5,

D10A, 4E10 e 9D3 com a sequência de aminoácidos original, de acordo com ID SEQ no.1. As inserções e substituições de aminoácidos são mostradas em negrito. Os primeiros 9 aminoácidos das variantes GC7, E8B, B7A, C2A, AC5, D10A, 4E10 e 9D3, conforme ilustrado em ID SEQ nos. 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 e 16 não são mostrados no alinhamento, porque são derivados de 9-hidroperóxido liase e não de ID SEQ no. 1.

A Figura 2 mostra o consumo de 13-HPOT em diferentes densidades celulares dos clones de *E. coli* que expressam a variante ou a 13-hidroperóxido liase original, respectivamente: pGC#7: círculos, p9D#3: triângulos, pD10#A: quadrados e pWT:

10 diamantes.

REIVINDICAÇÕES**1. POLIPEPTÍDEO ALTERADO DE 13-HIDROPERÓXIDO LIASE**

RECOMBINANTE, caracterizado por ser composto por uma sequência de aminoácidos que tem até 40 alterações nos aminoácidos, quando comparado à sequência de aminoácidos da proteína original, de acordo com o ID SEQ no. 1, compreendendo pelo menos as seguintes substituições: V3L, R4K, T5P e N208H em comparação com a sequência de aminoácidos da proteína do tipo original de acordo com a SEQ ID N1 e tendo a sequência de aminoácidos N-terminal ATPSSSSPE, o referido 13-hidroperóxido liase recombinante possuindo atividade enzimática aumentada quando comparado com a proteína do tipo original de acordo com a SEQ ID NO. 1.

2. POLIPEPTÍDEO ALTERADO DE 13-HIDROPERÓXIDO LIASE

RECOMBINANTE, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por compreender uma ou mais substituições, selecionadas do grupo formado por V3L, R4K, T5P, S19L, N208H, F340L, Y342F, K352R K352S, H354Y, F358Y, D359E, V360I, K371P, V372L, T375R, P377S, E382D, P383A, N387K, S388A, D389E, V392M, Q393G, N394E, D399S, D399N e N457K.

3. POLIPEPTÍDEO ALTERADO DE 13-HIDROPERÓXIDO LIASE

RECOMBINANTE, de acordo com a reivindicação 2, caracterizada por compreender também as substituições de aminoácido V360I e D399N.

4. POLIPEPTÍDEO ALTERADO DE 13-HIDROPERÓXIDO LIASE

RECOMBINANTE, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por compreender também as substituições K371P, V372L, T375R, P377S, E382D, P383A, N387K, S388A, D389E, V392M, Q393G, N394E e D399S.

5. POLIPEPTÍDEO ALTERADO DE 13-HIDROPERÓXIDO LIASE

RECOMBINANTE, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizada** por compreender também a inserção de aminoácidos K e G entre as posições 394 e 395 da sequência de aminoácidos da proteína original, de acordo com ID SEQ no. 1.

6. POLIPEPTÍDEO ALTERADO DE 13-HIDROPERÓXIDO LIASE RECOMBINANTE, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizada** por compreender também as substituições S19L, F340L, V360I e N457K.

7. POLIPEPTÍDEO ALTERADO DE 13-HIDROPERÓXIDO LIASE RECOMBINANTE, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizada** por compreender também as substituições F340L e N457K.

8. POLIPEPTÍDEO ALTERADO DE 13-HIDROPERÓXIDO LIASE RECOMBINANTE, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizada** por compreender também as substituições S19L, F340L, Y342F, K352R, F358Y, V360I e N457K.

9. POLIPEPTÍDEO ALTERADO DE 13-HIDROPERÓXIDO LIASE RECOMBINANTE, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizada** por compreender também as substituições F340L, Y342F, F358Y, D359E e V360I.

10. POLIPEPTÍDEO ALTERADO DE 13-HIDROPERÓXIDO LIASE RECOMBINANTE, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizada** por compreender também as substituições S19L, F358Y, V360I e N457K.

11. POLIPEPTÍDEO ALTERADO DE 13-HIDROPERÓXIDO LIASE RECOMBINANTE, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizada** por compreender também a substituição de aminoácido V360I.

12. POLIPEPTÍDEO ALTERADO DE 13-HIDROPERÓXIDO LIASE RECOMBINANTE, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizada** por

compreender também as substituições S19L, F340L, Y342F, K352S, H354Y, F358Y, V360I e N457K.

13. POLIPEPTÍDEO ALTERADO DE 13-HIDROPERÓXIDO LIASE RECOMBINANTE, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, **caracterizada** por uma sequência de aminoácidos selecionada dentre o grupo formado por ID SEQ nos. 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 ou 16.

14. MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO RECOMBINANTE, **caracterizada** pela sequência de nucleotídeos ser selecionada dentre o grupo composto por ID SEQs nos. 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 ou 17.

15. MICRO-ORGANISMO TRANSGÊNICO, **caracterizada** por compreender um vetor de expressão recombinante contendo uma molécula de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 14, selecionado a partir de bactérias do gênero *Escherichia*, fungos do gênero *Mortierella*, *Saprolegnia*, *Pythium*, leveduras do gênero *Saccharomyces*; cianobactérias, ciliados, algas ou protozoários; ou selecionados de *E. coli*, *B. subtilis*, *A. niger*, *A. nidulans*, *N. crassa*; *S. cerevisiae*, *K. lactis*, *H. polymorpha*, *P. pastoris*, *Y. lipolytica* e *Streptomyces* sp.

16. MÉTODO PARA PREPARAÇÃO DO POLIPEPTÍDEO DE 13-HIDROPERÓXIDO LIASE RECOMBINANTE, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, **caracterizado** pelo método compreender as etapas de:

- a) cultura de um micro-organismo transgênico a reivindicação 16, sob condições que permitam a expressão do polipeptídeo, e opcionalmente
- b) recuperação do polipeptídeo.

17. USO DA 13-HIDROPERÓXIDO LIASE RECOMBINANTE, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, **caracterizado** para clivagem de um 13-hidroperóxido de um ácido graxo poli-insaturado em um aldeído e um ácido

oxocarboxílico.

18. MÉTODO ENZIMÁTICO DE PRODUÇÃO DE ALDEÍDO-C6, caracterizado por ser compostos pelas etapas de:

- a) contato de um 13-hidroperóxido de um ácido graxo poli-insaturado, preferivelmente de ácido linoleico ou ácido alfa-linolênico, com a 13-hidroperóxido liase recombinante de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 13; e
- b) recuperação do aldeído-C6 produzido.

19. MÉTODO MICROBIANO DE PRODUÇÃO DE ALDEÍDO C6, caracterizado por ser composto das etapas de:

- a) contatar um 13-hidroperóxido de um ácido gordo polinsaturado, preferencialmente de ácido linoleico ou ácido alfa-linolênico, com um microrganismo contendo o referido mutante 13-hidroperóxido liase recombinante de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, e
- b) recuperar o aldeído-C6 produzido.

20. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 18 ou 19, **caracterizado** por compreender também a etapa de produção do 13-hidroperóxido pela atividade de uma 13-lipoxigenase.

21. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 18, 19 ou 20, **caracterizado** por compreendendo ainda os passos de reduzir o aldeído-C6 ao álcool correspondente por um agente redutor químico de uma enzima álcool desidrogenase e, opcionalmente, recuperar o álcool.

Figura 1

SH34GC7	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
SH34E8B										
SH33AC5	LPLKPIPGSYGWPILGPIIDRLDYFWFQGPETFFRKRIEKYSTVFRANVPCCFPFSNVNPNVVVLDCEFAHLFDMIEVEKSNVLVGDMPSPVKYTG									
SH33C2A	LPLKPIPGSYGWPILGPIIDRLDYFWFQGPETFFRKRIEKYSTVFRANVPCCFPFSNVNPNVVVLDCEFAHLFDMIEVEKSNVLVGDMPSPVKYTG									
SH33B7A	LPLKPIPGSYGWPILGPIIDRLDYFWFQGPETFFRKRIEKYSTVFRANVPCCFPFSNVNPNVVVLDCEFAHLFDMIEVEKSNVLVGDMPSPVKYTG									
SH30D10A	LPLKPIPGSYGWPILGPIIDRLDYFWFQGPETFFRKRIEKYSTVFRANVPCCFPFSNVNPNVVVLDCEFAHLFDMIEVEKSNVLVGDMPSPVKYTG									
SH324E10	LPLKPIPGSYGWPILGPIIDRLDYFWFQGPETFFRKRIEKYSTVFRANVPCCFPFSNVNPNVVVLDCEFAHLFDMIEVEKSNVLVGDMPSPVKYTG									
SH329D3	LPLKPIPGSYGWPILGPIIDRLDYFWFQGPETFFRKRIEKYSTVFRANVPCCFPFSNVNPNVVVLDCEFAHLFDMIEVEKSNVLVGDMPSPVKYTG									
Seq ID No. 1	LPVRTIPGSYGWPILGPIIDRLDYFWFQGPETFFRKRIEKYSTVFRANVPCCFPFSNVNPNVVVLDCEFAHLFDMIEVEKSNVLVGDMPSPVKYTG									
SH34GC7	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
SH34E8B										
SH33AC5	NIRVCAYLDTSEPOHAQVKNFAMDILKRSSKVWESEVISNLDTMWDTIESSLAKDGNASVIFPQKFLFNFLSKSIIIGADPAASPQVAKSGYAMLDRWLA									
SH33C2A	NIRVCAYLDTSEPOHAQVKNFAMDILKRSSKVWESEVISNLDTMWDTIESSLAKDGNASVIFPQKFLFNFLSKSIIIGADPAASPQVAKSGYAMLDRWLA									
SH33B7A	NIRVCAYLDTSEPOHAQVKNFAMDILKRSSKVWESEVISNLDTMWDTIESSLAKDGNASVIFPQKFLFNFLSKSIIIGADPAASPQVAKSGYAMLDRWLA									
SH30D10A	NIRVCAYLDTSEPOHAQVKNFAMDILKRSSKVWESEVISNLDTMWDTIESSLAKDGNASVIFPQKFLFNFLSKSIIIGADPAASPQVAKSGYAMLDRWLA									
SH324E10	NIRVCAYLDTSEPOHAQVKNFAMDILKRSSKVWESEVISNLDTMWDTIESSLAKDGNASVIFPQKFLFNFLSKSIIIGADPAASPQVAKSGYAMLDRWLA									
SH329D3	NIRVCAYLDTSEPOHAQVKNFAMDILKRSSKVWESEVISNLDTMWDTIESSLAKDGNASVIFPQKFLFNFLSKSIIIGADPAASPQVAKSGYAMLDRWLA									
Seq ID Nq. 1	NIRVCAYLDTSEPOHAQVKNFAMDILKRSSKVWESEVISNLDTMWDTIESSLAKDGNASVIFPQKFLFNFLSKSIIIGADPAASPQVAKSGYAMLDRWLA									
SH34GC7	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
SH34E8B										
SH33AC5	LQLLPTIHIGVLQPLVEIIFLHSAWYPPFALVSGDYNKLYQFIEKEGREAVEVERAKAEFGLTHQEAIHNLFFILGFNAFGGFSIFLPTLLSNILSDTTGLQDR									
SH33C2A	LQLLPTIHIGVLQPLVEIIFLHSAWYPPFALVSGDYNKLYQFIEKEGREAVEVERAKAEFGLTHQEAIHNLFFILGFNAFGGFSIFLPTLLSNILSDTTGLQDR									
SH33B7A	LQLLPTIHIGVLQPLVEIIFLHSAWYPPFALVSGDYNKLYQFIEKEGREAVEVERAKAEFGLTHQEAIHNLFFILGFNAFGGFSIFLPTLLSNILSDTTGLQDR									
SH30D10A	LQLLPTIHIGVLQPLVEIIFLHSAWYPPFALVSGDYNKLYQFIEKEGREAVEVERAKAEFGLTHQEAIHNLFFILGFNAFGGFSIFLPTLLSNILSDTTGLQDR									
SH324E10	LQLLPTIHIGVLQPLVEIIFLHSAWYPPFALVSGDYNKLYQFIEKEGREAVEVERAKAEFGLTHQEAIHNLFFILGFNAFGGFSIFLPTLLSNILSDTTGLQDR									
SH329D3	LQLLPTIHIGVLQPLVEIIFLHSAWYPPFALVSGDYNKLYQFIEKEGREAVEVERAKAEFGLTHQEAIHNLFFILGFNAFGGFSIFLPTLLSNILSDTTGLQDR									
Seq ID No. 1	LQLLPTIHIGVLQPLVEIIFLHSAWYPPFALVSGDYNKLYQFIEKEGREAVEVERAKAEFGLTHQEAIHNLFFILGFNAFGGFSIFLPTLLSNILSDTTGLQDR									

Figura 1 (2^a parte)

[illegible][illegible]

Figura 2

