



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

(21) BR 112019015411-6 A2



(22) Data do Depósito: 26/01/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 26/05/2020

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

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

(30) Prioridade Unionista: 27/01/2017 FR 1750696.

(71) Depositante(es): ENOBRAQ.

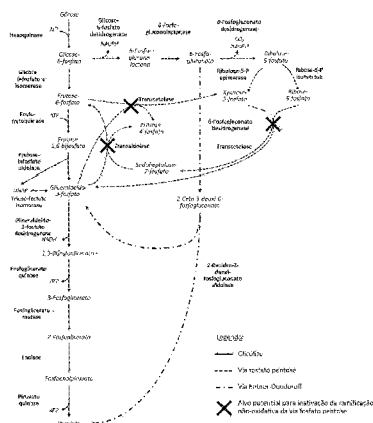
(72) Inventor(es): CÉDRIC BOISART; NICOLAS MORIN.

(86) Pedido PCT: PCT EP2018052004 de 26/01/2018

(87) Publicação PCT: WO 2018/138288 de 02/08/2018

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

(57) Resumo: A invenção se refere a um microrganismo geneticamente modificado expressando uma enzima RuBisCO funcional tipo I ou II e uma fosforibulocinase funcional (PRK), e no qual a ramificação não oxidativa da via das fosfato pentoses é pelo menos parcialmente inibida, sendo o referido microrganismo geneticamente modificado para produzir uma molécula exógena e/ou para superproduzir uma molécula endógena. A invenção também diz respeito ao uso de tal microrganismo geneticamente modificado para a produção ou superprodução de uma molécula de interesse e processos para a síntese ou bioconversão de moléculas de interesse.



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

Campo da Invenção

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

Estado da Técnica

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

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

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

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

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

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

Sumário da Invenção

[007] A vantagem de utilizar microrganismos não

fotossintéticos geneticamente modificados para capturar CO₂ e utilizá-lo como principal fonte de carbono, da mesma forma que as plantas e microrganismos fotossintéticos, já foi demonstrada. Por exemplo, microrganismos modificados para expressar um RuBisCO funcional (ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase - EC 4.1.1.39) e um PRK funcional (Fosforibuloquinase - EC 2.7.1.19) para reproduzir um ciclo de Calvin e converter a ribulose-5- fosfato em duas moléculas de 3-fosfoglicerato por captura de uma molécula de dióxido de carbono foram desenvolvidos.

[008] Ao trabalhar nas soluções fornecidas pelo ciclo de Calvin para produzir moléculas de interesse usando CO₂ como fonte de carbono, os inventores descobriram que ao acoplar parte do ciclo de Calvin (PRK/RuBisCO) a pelo menos a inibição parcial da ramificação não oxidativa da via de pentose-fosfato, foi possível aumentar o rendimento de produção das moléculas de interesse. Curiosamente, esta inibição, vantajosamente realizada a jusante da produção de 5-fosfato ribulose, promove o consumo de CO₂ exógeno pelo microrganismo. Os microrganismos assim desenvolvidos permitem produzir em larga escala e com um rendimento atrativo industrial, um grande número de moléculas de interesse, tais como aminoácidos, ácidos orgânicos, terpenos, terpenóides, peptídeos, ácidos graxos, polióis etc.

[009] A invenção se refere assim a um microrganismo geneticamente modificado que expressa uma enzima RuBisCO funcional e uma fosforibuloquinase funcional (PRK), e em que a ramificação não oxidativa da via das pentoses-fosfato é pelo menos parcialmente inibida, o referido microrganismo a ser geneticamente modificado de modo a produzir uma molécula exógena de interesse e/ou superproduzir uma molécula endógena de interesse, que não seja uma enzima RuBisCO e/ou fosforibuloquinase (PRK).

[0010] A invenção também diz respeito à utilização de um microrganismo geneticamente modificado de acordo com a invenção, para a produção ou excesso de produção de uma molécula de interesse, que não seja uma enzima RuBisCO e/ou um fosforibuloquinase (PRK), preferencialmente selecionado a partir de aminoácidos, peptídeos, proteínas, vitaminas, esteróis, flavonóides, terpenos, terpenóides, ácidos graxos, polióis e ácidos orgânicos.

[0011] A presente invenção se refere também a um processo biotecnológico para produzir ou superproduzir pelo menos uma molécula de interesse diferente de uma enzima RuBisCO e/ou uma fosforibuloquinase (PRK), caracterizada por compreender uma etapa de cultivar um microrganismo geneticamente modificado de acordo com a invenção, sob condições que permitem a síntese ou a bioconversão, pelo referido microrganismo, da referida molécula de interesse e,

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

[0012] Ela também diz respeito a um processo para produzir uma molécula de interesse diferente de uma enzima RuBisCO e/ou uma fosforibuloquinase (PRK), compreendendo (i) inserir pelo menos uma sequência que codifica uma enzima envolvida na síntese ou bioconversão da referida molécula de interesse em um microrganismo recombinante de acordo com a invenção, (ii) cultivar o referido microrganismo sob condições que permitem a expressão da referida enzima e opcionalmente (iii) recuperar e/ou purificar a referida molécula de interesse.

Descrição das Figuras

[0013] Figura 1: Representação esquemática da glicólise, a via Entner-Doudoroff e a via das pentoses-fosfato, que mostram a inibição da ramificação não oxidativa da via das pentoses-fosfato, de acordo com a invenção;

[0014] Figura 2: Representação esquemática da glicólise e a via das pentoses-fosfato, que mostra a inibição da ramificação não oxidativa da via das pentoses-fosfato e a gestão da ribulose-5-fosfato por PRK e RuBisCO, de acordo com a invenção.

Descrição Detalhada da Invenção

Definições

[0015] Os termos “*microrganismo recombinante*”,

"*microrganismo modificado*" e "*célula hospedeira recombinante*" são usados aqui de forma intercambiável e se referem a microrganismos que foram geneticamente modificados para expressar ou superexpressar sequências nucleotídicas endógenas, para expressar sequências nucleotídicas heterólogas, ou que possuem uma expressão alterada de um gene endógeno. "Alteração" significa que a expressão do gene, ou nível de uma molécula de RNA ou moléculas de RNA equivalentes codificando um ou mais polipeptídeos ou subunidades polipeptídicas, ou a atividade de um ou mais polipeptídeos ou subunidades polipeptídicas é regulada, de modo que a expressão, o nível ou a atividade é maior ou menor do que a observada na ausência de modificação.

[0016] É entendido que os termos "*microrganismo recombinante*", "*microrganismo modificado*" e "*célula hospedeira recombinante*" se referem não apenas ao microrganismo recombinante particular, mas à progênie ou à potencial progênie de tal microrganismo. Como algumas modificações podem ocorrer nas gerações subsequentes, devido à mutação ou influências ambientais, esses descendentes podem não ser idênticos à célula-mãe, mas eles ainda são compreendidos dentro do escopo do termo, conforme usados aqui.

[0017] No contexto da invenção, uma via metabólica pelo menos parcialmente "*inibida*" ou "*inativada*" se refere

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

inibição pode ser temporária ou permanente.

[0018] De acordo com a invenção, "*inibição da expressão gênica*" significa que o gene não é mais expresso no microrganismo considerado ou que sua expressão é reduzida, comparada com microrganismos do tipo selvagem (não geneticamente modificado para inibir a expressão gênica), levando à ausência da produção da proteína correspondente ou a um decréscimo significativo na sua produção e, em particular, a um decréscimo superior a 20%, mais preferencialmente 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%. Em uma modalidade, a inibição pode ser total, isto é, a proteína codificada pelo referido gene deixa de ser produzida de todo. A inibição da expressão gênica pode ser conseguida por deleção, mutação, inserção e/ou substituição de um ou mais nucleotídeos no gene considerado. Preferencialmente, a inibição da expressão do gene é conseguida por deleção total da sequência nucleotídica correspondente. De acordo com a invenção, qualquer método de inibição de genes, conhecido per se pelo especialista e aplicável a um microrganismo, pode ser usado. Por exemplo, a inibição da expressão gênica pode ser conseguida por recombinação homóloga (Datsenko et al., Proc Natl Acad Sci. USA 2000; 97: 6640-5; Lodish et al., Molecular Cell Biology 4^a ed. 2000. W. H. Freeman e Companhia, ISBN 0-7167-3136-3); mutagênese aleatória ou direcionada para modificar a expressão do gene e/ou a

atividade da proteína codificada (Thomas et al, Cell 1987; 51: 503-12); modificação de uma sequência promotora do gene para alterar a sua expressão (Kaufmann et al, Methods Mol Biol 2011; 765: 275-94 doi: 10,1007/978-1-61779-197-0_16); direcionando lesões locais induzidas em genomas (TILLING); conjugação etc. Outra abordagem particular é a inativação de genes por inserção de uma sequência estranha, por exemplo, por mutagênese por transposons utilizando elementos genéticos móveis (transposons), de origem natural ou artificial. De acordo com outra modalidade preferida, a inibição da expressão gênica é conseguida por técnicas de knock-out. A inibição da expressão gênica também pode ser alcançada extinguindo o gene usando RNA interferente, ribozima ou antissenso (Daneholt, 2006. Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina). No contexto da presente invenção, o termo "RNA interferente" ou "RNAi" se refere a qualquer molécula de RNAi (por exemplo, RNA de cadeia simples ou RNA de cadeia dupla) que pode bloquear a expressão de um gene alvo e/ou facilitar a degradação do mRNA correspondente. A inibição de genes também pode ser alcançada por métodos de edição de genoma que permitem a modificação genética direta de um dado genoma, através do uso de nucleases de dedo de zinco (Kim et al., PNAS; 93: 1156-1160), ou nucleases efetoras semelhantes a ativadores de transcrição, ou "TALEN" (Ousterout et al., Methods Mol Biol. 2016; 1338: 27-42. doi:

10.1007/978-1-4939-2932-0_3), um sistema que combina nucleases Cas9 com repetições palindrômicas curtas intervaladas agrupadas regularmente, ou "CRISPR" (Mali et al., Nat Methods. 2013 Oct; 10 (10): 957-63. doi: 10.1038/nmeth.2649), ou meganucleases (Daboussi et al., Nucleic Acids Res. 2012. 40: 6367-79). A inibição da expressão gênica também pode ser conseguida através da inativação da proteína codificada pelo referido gene.

[0019] No contexto da invenção, a biossíntese ou bioconversão "*dependente de NADPH*" ou "*consumidora de NADPH*" significa todas as vias de biossíntese ou bioconversão nas quais uma ou mais enzimas requerem o fornecimento concomitante de elétrons obtido pela oxidação de um cofator NADPH. As vias de biossíntese ou bioconversão "*dependentes de NADPH*" se referem nomeadamente à síntese de aminoácidos (por exemplo, arginina, lisina, metionina, treonina, prolina, glutamato, homoserina, isoleucina, valina), terpenóides e terpenos (por exemplo, farneseno), vitaminas e precursores (por exemplo, pantoato, pantotenato, transneurosporeno, filoquinona, tocoferóis), esteróis (por exemplo, esqualeno, colesterol, testosterona, progesterona, cortisona), flavonóides (por exemplo, frambinona, vestinona), ácidos orgânicos (por exemplo, ácido cumárico, ácido 3-hidroxipropiônico), polióis (por exemplo, sorbitol, xilitol, glicerol), poliaminas (por exemplo, espermidina),

moléculas aromáticas a partir da hidroxilação estereoespecífica, através de um citocromo p450 dependente de NADP (por exemplo, fenilpropanóides, terpenos, lipídios, taninos, fragrâncias, hormônios).

[0020] O termo "exógeno" como usados aqui em referência a várias moléculas (sequências de nucleotídeos, peptídeos, enzimas etc.) se refere a moléculas que não são normalmente ou naturalmente encontradas em e/ou produzidas pelo microrganismo considerado. Por outro lado, o termo "endógeno" ou "nativo" se refere a várias moléculas (sequências de nucleotídeos, peptídeos, enzimas etc.), designando moléculas que são normalmente ou naturalmente encontradas em e/ou produzidas pelo microrganismo considerado.

Microrganismos

[0021] A invenção propõe microrganismos geneticamente modificados para a produção de uma molécula de interesse, endógena ou exógena.

[0022] Microrganismo "*geneticamente modificado*" significa que o genoma do microrganismo foi modificado para incorporar uma sequência nucleica que codifica uma enzima envolvida na via de biossíntese ou bioconversão de uma molécula de interesse, ou que codifica um fragmento biologicamente ativo do mesmo. A referida sequência nucleica pode ter sido introduzida no genoma do referido microrganismo

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

[0023] Promotores utilizáveis na presente invenção incluem promotores constitutivos, isto é, promotores que são ativos na maioria dos estados celulares e condições ambientais, bem como promotores induzíveis que são ativados ou suprimidos por estímulos físicos ou químicos exógenos e, portanto, induzem um estado variável de expressão dependendo da presença ou ausência desses estímulos. Por exemplo, quando o microrganismo é uma levedura, é possível usar um promotor constitutivo, como o de um gene entre *TEF1*, *TDH3*, *PGI1*, *PGK*, *ADH1*. Exemplos de promotores induzíveis que podem ser

utilizados em levedura são *tetO-2*, *GAL10*, *GAL10-CYC1*, *PHO5*.

[0024] Em geral, o microrganismo geneticamente modificado de acordo com a invenção tem as seguintes características:

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

[0025] De acordo com a invenção, qualquer microrganismo pode ser usado. Preferivelmente, o microrganismo é uma célula eucariótica, preferencialmente selecionada de leveduras, fungos, microalgas ou uma célula procariótica, de um modo preferido, uma bactéria ou cianobactéria.

[0026] Em uma modalidade, o microrganismo geneticamente modificado de acordo com a invenção é uma levedura, preferencialmente selecionada a partir de entre os Ascomycetes (*Spermophthoraceae* e *Saccharomycetaceae*), Basidiomycetes (*Leucosporidium*, *Rhodospodium*, *Sporidiobolus*, *Filobasidium* e *Filobasidiella*) e leveduras

Deuteromycetes pertencentes aos fungos imperfeitos (Sporobolomycetaceae e Cryptococcaceae). Preferencialmente, a levedura geneticamente modificada de acordo com a invenção pertence ao gênero *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Cândida*, *Lipomyces*, *Rhodotorula*, *Rhodosporidium*, *Yarrowia* ou *Debaryomyces*. Mais preferencialmente, a levedura geneticamente modificada de acordo com a invenção é selecionada de *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis*, *Saccharomyces oviflis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodosporidium toruloides*, *Yarrowia lipolytica*, *Debaryomyces hansenii* e *Lipomyces starkeyi*.

[0027] Em outra modalidade, o microrganismo geneticamente modificado de acordo com a invenção é um fungo, e mais particularmente um fungo "filamentoso". No contexto da invenção, "fungos filamentosos" se refere a todas as formas filamentosas da subdivisão *Eumycotina*. Por exemplo, o fungo geneticamente modificado de acordo com a invenção pertence ao gênero *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Neurospora*, *Podospora*, *Endotia*, *Mucor*, *Cochliobolus* ou *Pyricularia*. Preferencialmente, o fungo geneticamente modificado de

acordo com a invenção é selecionado de *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus awomari*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus terreus*, *Neurospora crassa*, *Trichoderma reesei* e *Trichoderma viride*.

[0028] Em outra modalidade, o microrganismo geneticamente modificado de acordo com a invenção é uma microalga. No contexto da invenção, "microalga" se refere a todas as algas microscópicas eucarióticas, preferencialmente pertencentes às classes ou superclasses Chlorophyceae, Chrysophyceae, Prymnesiophyceae, Diatomae ou Bacillariophyta, Euglenophyceae, Rhodophyceae ou Trebouxiophyceae. Preferencialmente, as microalgas geneticamente modificadas de acordo com a invenção são selecionadas de *Nannochloropsis* sp. (por exemplo, *Nannochloropsis oculata*, *Nannochloropsis gaditana*, *Nannochloropsis salina*), *Tetraselmis* sp. (por exemplo, *Tetraselmis suecica*, *Tetraselmis chuii*), *Chlorella* sp. (por exemplo, *Chlorella salina*, *Chlorella protothecoides*, *Chlorella ellipsoidea*, *Chlorella emersonii*, *Chlorella minutissima*, *Chlorella pyrenoidosa*, *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella vulgaris*), *Chlamydomonas* sp. (por exemplo, *Chlamydomonas reinhardtii*) *Dunaliella* sp. (por exemplo, *Dunaliella tertiolecta*, *Dunaliella salina*), *Phaeodactylum tricornutum*, *Botryococcus braunii*, *Chroomonas salina*, *Cyclotella cryptica*, *Cyclotella* sp., *Ettlia texensis*,

Euglena gracilis, *Gymnodinium nelsoni*, *Haematococcus pluvialis*, *Isochrysis galbana*, *Monoraphidium minutum*, *Monoraphidium sp.*, *Neocloro oleoabundans*, *Nitzschia laevis*, *Onoraphidium sp.*, *Pavlova lutheri*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Porphyridium cruentum*, *Scenedesmus sp.* (por exemplo, *Scenedesmus obliquuus*, *Scenedesmus quadricaulaula*, *Scenedesmus sp.*), *Stichococcus bacillaris*, *Spirulina platensis*, *Thalassiosira sp.*

[0029] Em uma modalidade, o microrganismo geneticamente modificado de acordo com a invenção é uma bactéria, de preferência selecionado de entre os filos Acidobacteria, Actinobactérias, Aquificae, Bacterioidetes, Chlamydia, Chlorobi, Chloroflexi, Chrysiogenetes, Cianobactérias, Deferribacteres, Deinococcus-Thermus, Dictyoglomi, Fibrobacteres, Firmicutes, Fusobacteria, Gemmatimonadetes, Nitrospirae, Planctomycetes, Proteobacteria, Spirochaetes, Thermodesulfobacteria, Thermomicrobia, Thermotogae ou Verrucomicrobia. De preferência, a bactéria geneticamente modificada de acordo com a invenção pertence ao gênero *Acaryochloris*, *Acetobacter*, *Actinobacillus*, *Agrobacterium*, *Alicyclobacillus*, *Anabaena*, *Anacystis*, *Anaerobiospirillum*, *Aquifex*, *Arthrobacter*, *Arthrospira*, *Azobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Burkholderia*, *Chlorobium*, *Chromatium*, *Chlorobaculum*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Cupriavidus*,

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

pudica, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizobium etli*, *Rhodobacter capsulatus*, *sphaeroides Rhodobacter*, *Rhodospirillum rubrum*, *Salmonella enterica*, *Salmonella entérica*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Streptomyces coelicolor*, *Zymomonas mobilis*, *Acaryochloris marina*, *Anabaena variabilis*, *Arthrospira platensis*, *Arthrospira maxa*, *Chlorobium tepidum*, *Chlorobaculum sp.*, *Cyanothece sp.*, *Gloeobacter violaceus*, *Microcystis aeruginosa*, *Nostoc punctiforme*, *Prochlorococcus marinus*, *Synechococcus elongatus*, *Synechocystis sp.*, *Thermosynechococcus elongatus*, *Trichodesmium erythraeum* e *Rhodopseudomonas palustris*.

Expressão de um RuBisCO funcional e um PRK funcional

[0030] De acordo com a invenção, o microrganismo pode expressar naturalmente um RuBisCO funcional e um PRK funcional. Este é o caso, por exemplo, de microrganismos fotossintéticos, tais como microalgas e cianobactérias.

[0031] Existem várias formas de RuBisCO na natureza (Tabita et al, J Exp Bot. 2008; 59 (7): 1515-24. doi: 10.1093/jxb/erm361). As formas I, II e III catalisam as reações de carboxilação e oxigenação da ribulose-1,5-bifosfato. A Forma I está presente em eucariotos e bactérias. Consiste em dois tipos de subunidades: subunidades grandes (RbcL) e subunidades pequenas (RbcS). O complexo enzimático

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

[0032] Duas classes de PRKs são conhecidas: as enzimas de classe I encontradas em proteobactérias são octâmeras, enquanto as enzimas de classe II encontradas em cianobactérias e plantas são tetrâmeras ou dímeras. Dependendo do organismo, os genes que codificam um PRK podem

ser chamados *prk* (por exemplo, *Synechococcus elongatus*), *prkA* (por exemplo *Chlamydomonas reinhardtii*), *prkB* (por exemplo, *Escherichia coli*), *prk1*, *prk2* (por exemplo, *Leptolyngbya* sp.), *CbbP* (por exemplo, *Nitrobacter vulgaris*) ou *cfxP* (por exemplo, *Cupriavidus necator*).

[0033] No caso em que o microrganismo utilizado não expressa naturalmente um RuBisCO funcional e um PRK funcional, o referido microrganismo é geneticamente modificado para expressar RuBisCO e PRK heterólogos. Vantajosamente, em tal caso, o microrganismo é transformado de modo a integrar no seu genoma um ou mais cassetes de expressão integrando as sequências que codificam as referidas proteínas e, vantajosamente, os fatores de transcrição apropriados. Dependendo do tipo de RuBisCO a ser expresso, também pode ser necessário ter uma ou mais proteínas chaperonas expressas pelo microrganismo, a fim de promover a montagem adequada das subunidades que formam o RuBisCO. Este é particularmente o caso do RuBisCO do tipo I, onde a introdução e expressão de genes que codificam uma chaperona específica (*Rbcx*) e chaperonas generalistas (*GroES* e *GroEL*, por exemplo) são necessárias para obter um RuBisCO funcional. O pedido W02015/107496 descreve em detalhe como modificar geneticamente uma levedura para expressar um tipo funcional I RuBisCO e PRK. Também é possível referir-se ao método descrito em GUADALUPE-MEDINA et al. (Biotechnology

for Biofuels, 6, 125, 2013).

[0034] Em uma modalidade, o microrganismo é geneticamente modificado para expressar um RuBisCO tipo I. Em outra modalidade, o microrganismo é geneticamente modificado para expressar um RuBisCO tipo II. Em outra modalidade, o microrganismo é geneticamente modificado para expressar um RuBisCO do tipo III.

[0035] As Tabelas 1 e 2 abaixo listam, como exemplos, as sequências que codificam RuBisCO e PRK que podem ser usadas para transformar um microrganismo para expressar um RuBisCO funcional e um PRK funcional.

Tabela 1: Exemplos de sequências que codificam um RuBisCO

Gene	GenBank	GI	Organismo
rbcL	BAD78320.1	56685098	<i>Synechococcus elongatus</i>
rbcS	BAD78319.1	56685097	<i>Synechococcus elongatus</i>
cbbL2	CAJ96184.1	113529837	<i>Cupriavidus necator</i>
cbbS	P09658.2	6093937	<i>Cupriavidus necator</i>
cbbM	P04718.1	132036	<i>Rhodospirillum rubrum</i>
cbbM	Q21YM9.1	115502580	<i>Rhodoferrax ferrireducens</i>
cbbM	Q479W5.1	115502578	<i>Dechloromonas aromatica</i>
rbcL	O93627.5	37087684	<i>Thermococcus kodakarensis</i>
cbbL	CQR50548.1	811260688	<i>Haloferax</i> sp. Arc-Hr

Tabela 2: Exemplos de sequências que codificam um PRK

Gene	GenBank	GI	Organismo
Prk	BAD78757.1	56685535	<i>Synechococcus elongatus</i>

cfXP	P19923.3	125575	<i>Cupriavidus necator</i>
PRK	P09559.1	125579	<i>Spinacia oleracea</i>
cbbP	P37100.1	585367	<i>Nitrobacter vulgaris</i>

Inibição da ramificação não oxidativa da via das pentoses-fosfato

[0036] De acordo com a invenção, a ramificação não oxidativa da via das pentoses-fosfato é pelo menos parcialmente inibida, de modo que o microrganismo deixa de poder aderir à via da glicólise através da via das pentoses-fosfato.

[0037] Preferencialmente, o microrganismo é geneticamente modificado para inibir a ramificação não oxidativa da via das pentoses-fosfato a jusante da produção de ribulose-5- fosfato (Figura 1).

[0038] A interrupção da ramificação não oxidativa da via das pentoses-fosfato a jusante da produção de ribulose-5- fosfato (Ru5P) é vantajosamente conseguida pela inibição pelo menos parcial de uma transaldolase (E.C. 2.2.2.1.2) normalmente produzida pelo microrganismo.

[0039] A transaldolase é uma enzima que catalisa uma reação do tipo transferase entre os pares de metabólitos sedoheptulose 7-fosfato/gliceraldeído 3-fosfato e eritrose-4-fosfato/frutose 6-fosfato.

[0040] Dependendo do organismo, os genes que codificam transaldolase podem ser chamados tal, talA, talB (por exemplo, em *Escherichia coli*, *Synechocystis* sp.),

TALDO, TALDO1, TALDOR (por exemplo, em *Homo sapiens*, *Mus musculus*), TAL1 (por exemplo, em *Saccharomyces cerevisiae*), TAL2 (por exemplo, em *Nostoc punctiforme*), talA1, talA2 (por exemplo, *Streptococcus gallolyticus*), talB1, talB2 (por exemplo, *Azotobacter vinelandii*), ou NQM1 (por exemplo, em *Saccharomyces cerevisiae*).

[0041] Alternativamente ou adicionalmente, a interrupção da ramificação não oxidativa da via das pentoses-fosfato a jusante da produção de ribulose-5-fosfato (Ru5P) pode ser obtida pela inibição pelo menos parcial de uma transcetolase (EC 2.2.2.1.1) normalmente produzida pelo microrganismo.

[0042] A transcetolase é uma enzima que catalisa uma reação transferase entre os pares de metabólitos sedoheptulose-7-fosfato/gliceraldeído 3-fosfato e ribose-5-fosfato/xilulose-5-fosfato, bem como entre os pares frutose-6-fosfato/gliceraldeído 3-fosfato e eritrose-4-fosfato/xilulose-5-fosfato. Dependendo do organismo, os genes que codificam a transcetolase podem ser designados por TKL, TKL1, TKL2 (por exemplo, *Saccharomyces cerevisiae*), tk1A, tk1B (por exemplo, *Rhodobacter sphaeroides*), tktA, tktB (por exemplo, *Escherichia coli*), TKT, TKT1, TKT2 (por exemplo, *Homo sapiens*, *Dictyostelium discoideum*), ou TKTL1, TKTL2 (por exemplo, *Bos taurus*), ou cbbT, cbbTC, cbbTP (por exemplo, *Cupriavidus necator*, *Synechococcus* sp.).

[0043] Em um exemplo particular, o microrganismo é geneticamente modificado de modo que a expressão do gene que codifica a transaldolase é pelo menos parcialmente inibida. Preferencialmente, a expressão gênica é completamente inibida. Alternativamente ou adicionalmente, o microrganismo é geneticamente modificado de modo que a expressão do gene que codifica a transcetolase é pelo menos parcialmente inibida. Preferencialmente, a expressão gênica é completamente inibida.

[0044] As tabelas 3 e 4 abaixo listam, como exemplos, as sequências que codificam uma transaldolase ou uma transcetolase, que podem ser inibidas dependendo do microrganismo alvo. O especialista sabe qual gene corresponde à enzima de interesse a ser inibida dependendo do microrganismo.

Tabela 3: Exemplos de sequências que codificam uma transaldolase

Gene	GenBank	GI	Organismo
TAL1	P15019.4	1729825	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NQM1	P53228.1	1729826	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
talA	BAA21821.1	2337774	<i>Escherichia coli</i>
talB	BAA16812.1	1651885	<i>Synechocystis</i> sp.

Tabela 4: Exemplos de sequências que codificam uma transcetolase

Gene	GenBank	GI	Organismo
------	---------	----	-----------

TKL1	NP_015399.1	6325331	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
TKL2	NP_009675.3	398364879	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
tktA	AAA69102.1	882464	<i>Escherichia coli</i>
cbbT	AHF62567.1	572996306	<i>Synechococcus</i> sp.

[0045] Em geral, a junção entre a via das pentoses-fosfato e da via da glicólise não é mais possível por meio da ramificação não oxidativa da via das pentoses-fosfato, ou pelo menos significativamente diminuída, no microrganismo geneticamente modificado de acordo com a invenção.

[0046] Em uma modalidade exemplificativa particular, o microrganismo é uma levedura do gênero *Saccharomyces cerevisiae* em que a expressão do gene NQM1 e/ou TAL1 é pelo menos parcialmente inibida.

[0047] Em outra modalidade, exemplar em particular, o microrganismo é uma bactéria do gênero *Escherichia coli* em que a expressão do gene da talA é pelo menos parcialmente inibida.

[0048] De acordo com a invenção, o microrganismo geneticamente modificado, que expressa um RuBisCO funcional e um PRK funcional, e cuja ramificação não oxidativa da via das pentoses-fosfato é pelo menos parcialmente inibida, não é mais capaz de se unir à via da glicólise através das pentoses-fosfato. Por outro lado, é capaz de produzir gliceraldeído-3-fosfato (G3P) a partir de Ru5P sintetizado pela ramificação oxidativa da via das pentoses-fosfato,

através da expressão heteróloga de PRK e RuBisCO, enquanto fixa uma molécula de carbono adicional (Figura 2).

[0049] Assim, o microrganismo geneticamente modificado é capaz de produzir NADPH através da ramificação oxidativa da via das pentoses-fosfato, e G3P através da expressão heteróloga de PRK e RuBisCO, usando CO₂ exógeno, e em particular CO₂ atmosférico, como fonte de carbono complementar.

[0050] Assim, o microrganismo geneticamente modificado de acordo com a invenção torna possível aumentar o rendimento de carbono, fixando e utilizando CO₂ exógeno, para a produção de NADPH e G3P (e subsequentemente moléculas de interesse). Aqui, novamente, há um aumento no rendimento de carbono.

Inibição da via Entner-Doudoroff

[0051] Em uma modalidade particular, o microrganismo geneticamente modificado de acordo com a invenção tem uma via Entner-Doudoroff, e esta é, pelo menos parcialmente, inibida. Esta via, encontrada principalmente em bactérias (especialmente bactérias Gram-negativas), é uma alternativa à glicólise e à via das pentoses para a produção de piruvato a partir da glicose. Mais precisamente, esta via se liga à via das pentoses-fosfato no gluconato-P para fornecer glicólise, particularmente em piruvato.

[0052] Preferencialmente, o microrganismo é

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

[0053] A interrupção da via Entner-Doudoroff a jusante da produção de 6-fosfogluconato atinge especificamente uma ou mais reações no processo de síntese de piruvato a partir do 6-fosfogluconato. Esta síntese é iniciada pelas ações sucessivas de duas enzimas: (i) 6-fosfogluconato desidratase ("EDD" - EC. 4.2.1.12), e (ii) 2-desidro-3-desoxi-fosfogluconato alfa aldolase ("EDA" - EC 4.1.2.14).

[0054] A 6-fosfogluconato desidratase catalisa a desidratação do 6-fosfogluconato em 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato. Dependendo do organismo, os genes que codificam a 6-fosfogluconato desidratase podem ser denominados *edd* (GenBank NP_416365, por exemplo, em *Escherichia coli*), ou *ilvD* (por exemplo, em *Mycobacterium* sp.).

[0055] A 2-desidro-3-desoxi-fosfogluconato aldolase catalisa a síntese de uma molécula de piruvato e uma molécula de gliceraldeído-3-fosfato a partir do 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato produzido por 6-fosfogluconato desidratase. Dependendo do organismo, os genes que codificam a 2-desidro-

3-desoxi-fosfogluconato aldolase podem ser chamados de *eda* (GenBank NP_416364, por exemplo, em *Escherichia coli*), ou *kdgA* (por exemplo, em *Thermoproteus tenax*), ou *dgaF* (por exemplo, em *Salmonella typhimurium*).

[0056] Em um exemplo particular, o microrganismo é geneticamente modificado de modo que a expressão do gene que codifica a 6-fosfogluconato desidratase é pelo menos parcialmente inibida. Preferencialmente, a expressão gênica é completamente inibida.

[0057] Alternativamente ou adicionalmente, o microrganismo é geneticamente modificado de modo que a expressão do gene que codifica a 2-desidro-3-desoxi-fosfogluconato aldolase é pelo menos parcialmente inibida. Preferencialmente, a expressão gênica é completamente inibida.

[0058] As Tabelas 5 e 6 abaixo listam, como exemplos, as sequências que codificam uma 6-fosfogluconato desidratase e uma 2-desidro-3-desoxi-fosfogluconato aldolase que podem ser inibidas dependendo do microrganismo alvo. O especialista sabe qual gene corresponde à enzima de interesse a ser inibida dependendo do microrganismo.

Tabela 5: Exemplos de sequências que codificam um EDD

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

edd	AJQ65426.1	764046652	<i>Salmonella enterica</i>
-----	------------	-----------	----------------------------

Tabela 6: Exemplos de sequências que codificam uma EDA

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

[0059] Em geral, nesta modalidade, a produção de piruvato não é mais possível através da via Entner-Doudoroff, ou pelo menos significativamente reduzida.

[0060] Em uma modalidade exemplificativa particular, o microrganismo é uma bactéria do gênero *Escherichia coli* em que a expressão do gene *edd* é pelo menos parcialmente inibida.

[0061] Em um exemplo particular, a bactéria do gênero *Escherichia coli* é geneticamente modificada de modo a que a expressão dos genes *talA* e *edd* seja pelo menos parcialmente inibida.

[0062] De acordo com a invenção, o microrganismo geneticamente modificado, que expressa um RuBisCO funcional e um PRK funcional, e cuja ramificação não oxidativa da via das pentoses-fosfato e da via Entner-Doudoroff são pelo menos parcialmente inibidas, não é mais capaz de produzir piruvato pela via Entner-Doudoroff ou pela via das pentoses-fosfato. O fluxo de carbono da glicose durante a produção de NADPH é, portanto, de preferência direcionado para a engenharia de

PRK/RuBisCO.

Produção de moléculas de interesse

[0063] De acordo com a invenção, o microrganismo geneticamente modificado é transformado de modo a produzir uma molécula exógena de interesse e/ou superproduzir uma molécula endógena de interesse.

[0064] No contexto da invenção, a molécula de interesse se refere preferencialmente a uma pequena molécula orgânica com uma massa molecular menor ou igual a 0,8 kDa.

[0065] Em geral, modificações genéticas feitas no microrganismo, como descrito acima, melhoram o rendimento de carbono das vias de síntese e/ou bioconversão de moléculas de interesse.

[0066] No contexto da invenção, o rendimento "melhorado" se refere à quantidade do produto acabado. Em geral, no contexto da invenção, o rendimento de carbono corresponde à razão entre a quantidade de produto acabado e a quantidade de açúcar fermentável, particularmente em peso. De acordo com a invenção, o rendimento de carbono é aumentado nos microrganismos geneticamente modificados de acordo com a invenção, em comparação com microrganismos do tipo selvagem, colocados sob condições de cultura idênticas. Vantajosamente, o rendimento de carbono é aumentado em 2%, 5%, 10%, 15%, 18%, 20% ou mais. O microrganismo geneticamente modificado de acordo com a invenção pode produzir uma

quantidade maior de moléculas de interesse (produto acabado) do que moléculas heterólogas produzidas por um microrganismo geneticamente modificado simplesmente para produzir ou produzir em excesso essa molécula. De acordo com a invenção, o microrganismo genético também pode produzir em excesso uma molécula endógena em comparação com o microrganismo do tipo selvagem. A superprodução de uma molécula endógena é entendida principalmente em termos de quantidades. Vantajosamente, o microrganismo geneticamente modificado produz pelo menos 20%, 30%, 40%, 50% ou mais em peso da molécula endógena do que o microrganismo do tipo selvagem. Vantajosamente, o microrganismo de acordo com a invenção é geneticamente modificado de modo a produzir ou superproduzir pelo menos uma molécula entre aminoácidos, terpenóides, terpenos, vitaminas e/ou precursores de vitaminas, esteróis, flavonóides, ácidos orgânicos, polióis, poliaminas, moléculas aromáticas obtidas de hidroxilação estereoespecífica, através de um citocromo p450 dependente de NADP etc.

[0067] Em um exemplo particular, o microrganismo é geneticamente modificado para superproduzir pelo menos um aminoácido, selecionado preferencialmente de arginina, lisina, metionina, treonina, prolina, glutamato, homoserina, isoleucina e valina.

[0068] Em um exemplo particular, o microrganismo é

geneticamente modificado para produzir ou superproduzir moléculas da via terpenóide, tal como o farneseno, e da via do terpeno.

[0069] Em um exemplo particular, o microrganismo é geneticamente modificado para produzir ou superproduzir uma vitamina ou precursor, selecionado preferencialmente de pantoato, pantotenato, transneurosporeno, filoquinona e tocoferóis.

[0070] Em um exemplo particular, o microrganismo é geneticamente modificado para produzir ou superproduzir um esterol, preferencialmente selecionado de esqualeno, colesterol, testosterona, progesterona e cortisona.

[0071] Em um exemplo particular, o microrganismo é geneticamente modificado para produzir ou superproduzir um flavonóide, preferencialmente selecionado de frambinona e vestinona.

[0072] Em um exemplo particular, o microrganismo é geneticamente modificado para produzir ou superproduzir um ácido orgânico, preferencialmente selecionado a partir do ácido cumárico e do ácido 3-hidroxipropiônico.

[0073] Em um exemplo particular, o microrganismo é geneticamente modificado para produzir ou superproduzir um poliol, selecionado preferencialmente de sorbitol, xilitol e glicerol.

[0074] Em um exemplo particular, o microrganismo é

geneticamente modificado para produzir ou superproduzir uma poliamina, preferencialmente a espermidina.

[0075] Em um exemplo particular, o microrganismo é geneticamente modificado para produzir ou superproduzir uma molécula aromática a partir de uma hidroxilação estereoespecífica, através de um citocromo p450 dependente de NADP, selecionado preferencialmente de fenilpropanóides, terpenos, lipídios, taninos, fragrâncias, hormônios.

[0076] No caso em que a molécula de interesse é obtida por bioconversão, o microrganismo geneticamente modificado é vantajosamente cultivado em um meio de cultura incluindo o substrato a ser convertido. Em geral, a produção ou superprodução de uma molécula de interesse por um microrganismo geneticamente modificado de acordo com a invenção é obtida cultivando o referido microrganismo em um meio de cultura apropriado conhecido do especialista.

[0077] O termo "meio de cultura apropriado" geralmente se refere a um meio de cultura estéril que fornece nutrientes essenciais ou benéficos para a manutenção e/ou crescimento do referido microrganismo, tais como fontes de carbono; fontes de nitrogênio, tais como sulfato de amônio; fontes de fósforo, por exemplo, fosfato de potássio monobásico; oligoelementos, por exemplo, sais de cobre, iodeto, ferro, magnésio, zinco ou molibdato; vitaminas e outros fatores de crescimento, tais como aminoácidos ou

outros promotores de crescimento. Um agente antiespumante pode ser adicionado conforme necessário. De acordo com a invenção, este meio de cultura apropriado pode ser quimicamente definido ou complexo. O meio de cultura pode assim ser idêntico ou semelhante em composição a um meio sintético, como definido por Verduyn et al. (Yeast. 1992. 8: 501-17), adaptado por Visser et al. (Biotechnology and bioengineering. 2002. 79: 674-81), ou comercialmente disponível tal como meio de base de nitrogênio de levedura (YNB) (MP Biomedicals ou Sigma-Aldrich).

[0078] Em particular, o meio de cultura pode incluir uma fonte de carbono simples, tal como glicose, galactose, sacarose, melaço ou os subprodutos destes açúcares, opcionalmente suplementados com CO₂ como co-substrato de carbono. De acordo com a presente invenção, a fonte de carbono simples deve permitir o crescimento normal do microrganismo de interesse. Também é possível, em alguns casos, usar uma fonte de carbono complexa, tal como biomassa lignocelulósica, palha de arroz ou amido. O uso de uma fonte de carbono complexa geralmente requer pré-tratamento antes do uso.

[0079] Em uma modalidade particular, o meio de cultura contém fonte de, pelo menos, um carbono entre os monossacarídeos, tais como glicose, xilose ou a arabinose, dissacarídeos tais como sacarose, ácidos orgânicos tais como

acetato, butirato, propionato ou valerato de promover a diferentes tipos de poli-hidroxialcanoato (PHA), glicerol tratado ou não tratado.

[0080] Dependendo das moléculas a serem produzidas e/ou superproduzidas, é possível explorar o fornecimento de fatores nutricionais (N, O, P, S, K⁺, Mg²⁺, Fe²⁺, Mn, Co, Cu, Ca, Sn; Koller et al., Microbiology Monographs, G.-Q. Chen, 14: 85-119, (2010)). Este é particularmente o caso para promover a síntese e acumulação intracelular de PHA incluindo PHB.

[0081] De acordo com a invenção, qualquer método de cultura que permita a produção em escala industrial de moléculas de interesse pode ser considerado. Vantajosamente, a cultura é feita em biorreatores, especialmente em modo de cultura em lote, alimentado em lote e/ou contínuo. Preferencialmente, a cultura associada com a produção da molécula de interesse é em modo alimentado em lote correspondendo a um fornecimento controlado de um ou mais substratos, por exemplo, pela adição de uma solução concentrada de glicose cuja concentração pode ser entre 200 g/L e 700 g/L. Um fornecimento controlado de vitaminas durante o processo pode também ser benéfico para a produtividade (Alfenore et al., Appl Microbiol Biotechnol. 2002. 60: 67-72). Também é possível adicionar uma solução de sal de amônio para limitar o suprimento de nitrogênio.

[0082] A fermentação é geralmente realizada em biorreatores, com possíveis etapas de pré-culturas sólidas e/ou líquidas em frascos de Erlenmeyer, com um meio de cultura apropriado contendo pelo menos uma fonte de carbono simples e/ou um suprimento de CO₂ exógeno, necessário para a produção da molécula interesse.

[0083] Em geral, as condições de cultura dos microrganismos de acordo com a invenção são facilmente adaptáveis pelo perito, dependendo do microrganismo e/ou da molécula a ser produzida/superproduzida. Por exemplo, a temperatura da cultura está entre 20 °C e 40 °C para leveduras, preferivelmente entre 28 °C e 35 °C, e mais particularmente em torno de 30 °C, para *S. cerevisiae*. A temperatura da cultura é entre 25 °C e 35 °C, preferivelmente 30 °C, para o *Cupriavidus necator*.

[0084] A invenção, portanto, também se refere ao uso de um microrganismo geneticamente modificado de acordo com a invenção, para a produção ou superprodução de uma molécula de interesse, diferente de uma enzima RuBisCO e/ou fosforibuloquinase (PRK), e preferencialmente selecionados de aminoácidos, peptídeos, proteínas, vitaminas, esteróis, flavonóides, terpenos, terpenóides, ácidos graxos, polióis e ácidos orgânicos.

[0085] A invenção também diz respeito a um processo biotecnológico para a produção de pelo menos uma molécula de

interesse que não seja uma enzima RuBisCO e/ou um fosforibuloquinase (PRK), caracterizado pelo fato de que compreende uma etapa de cultura de um microrganismo geneticamente modificado de acordo com a invenção, sob condições permitindo a síntese ou bioconversão, pelo referido microrganismo, da referida molécula de interesse e, opcionalmente, uma etapa de recuperação e/ou purificação da referida molécula de interesse.

[0086] Em uma modalidade particular, o microrganismo é geneticamente modificado para expressar pelo menos uma enzima envolvida na síntese da referida molécula de interesse.

[0087] Em uma outra modalidade particular, o microrganismo é geneticamente modificado para expressar pelo menos uma enzima envolvida na bioconversão da referida molécula de interesse.

[0088] A invenção também se refere a um processo para a produção de uma molécula de interesse que compreende: (i) inserir pelo menos uma sequência que codifica uma enzima envolvida na síntese ou bioconversão da referida molécula de interesse em um microrganismo recombinante de acordo com a invenção, (ii) cultivar o referido microrganismo em condições que permitam a expressão da referida enzima e opcionalmente (iii) recuperar e/ou purificar a referida molécula de interesse.

[0089] Por exemplo, é possível produzir farneseno por uma levedura, tal como uma levedura do gênero *Saccharomyces cerevisiae*, geneticamente modificada para expressar PRK e RuBisCO funcionais, uma farneseno sintase e em que a expressão de um gene TAL1 (Gene ID: 851068) é pelo menos parcialmente inibida.

[0090] Também é possível superproduzir o glutamato por uma bactéria, tal como uma bactéria do gênero *Escherichia coli*, geneticamente modificada para expressar PRK e RuBisCO funcionais, e em que a expressão dos genes talA (Gene ID: 947006.) e sucA (Gene ID: 945303) é pelo menos parcialmente inibida.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Análise de Bioinformática

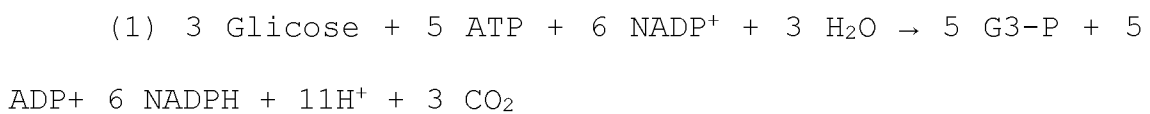
a) Comparação dos rendimentos de fixação de carbono da glicose entre uma cepa do tipo selvagem utilizando a via das pentoses-fosfato e glicólise e uma cepa modificada de acordo com a invenção

[0091] De modo a avaliar o benefício das modificações de acordo com a invenção, os cálculos do rendimento teórico foram realizados com base na estequiometria das reações envolvidas.

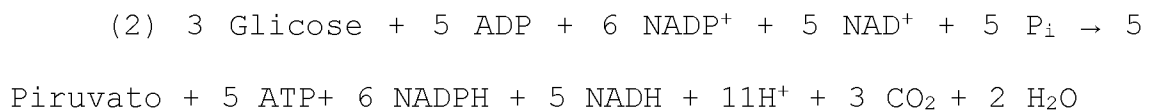
[0092] Dois casos foram analisados: (i) uma cepa do tipo selvagem, usando a via das pentoses-fosfato para fornecer uma via biossintética dependente de NADPH (por

exemplo, síntese de farneseno), e (ii) uma cepa modificada de acordo com a invenção, sob as mesmas condições.

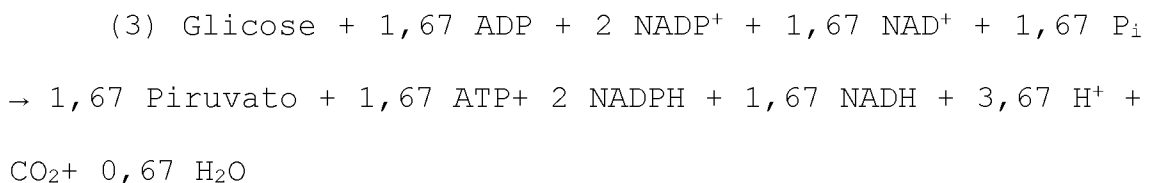
[0093] No contexto da melhoria das vias biossintéticas dependentes de NADPH, o equilíbrio teórico da formação de NADPH e gliceraldeído-3-fosfato (G3-P) a partir da glicose através da via das pentoses-fosfato foi calculado de acordo com a seguinte equação (1):



[0094] Descendo para a formação de piruvato a partir do G3P, chegamos ao seguinte balanço:



[0095] Se normalizarmos o balanço por um mol de glicose, obtemos o seguinte rendimento:

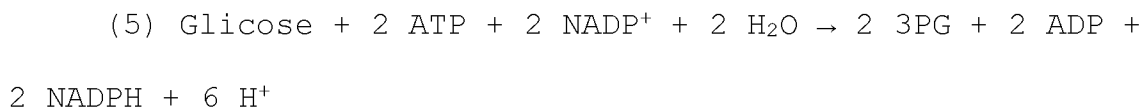


[0096] Através da via das pentoses, 1,67 moles de piruvato e 2 moles de NADPH são produzidos a partir de um mol de glicose. No entanto, um mol de carbono é perdido pela descarboxilação durante a formação de ribulose 5-fosfato pela 6-fosfogluconato desidrogenase (EC 1.1.1.44).

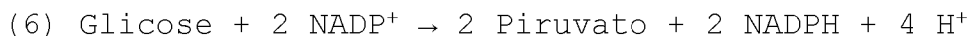
[0097] O rendimento máximo teórico de produção de piruvato quando se produz 2 NADPH pela via das pentoses-

fosfato é, portanto, $0,82 \text{ g}_{\text{piruvato}}/\text{g}_{\text{glicose}}$ (g de piruvato sintetizado, por glicose consumida).

[0098] Ao integrar a engenharia de PRK/RuBisCO em uma cepa inibida para a ramificação não oxidativa da via das pentoses-fosfato (por exemplo, $\Delta\text{TAL1-}\Delta\text{NQM1}$ na levedura *S. cerevisiae*), o fluxo de fixação de carbono é redirecionado a partir da ramificação oxidativa da via das pentoses-fosfato para a engenharia de PRK/RuBisCO (Figura 2). Este fluxo está relacionado com o final da via da glicólise, ao nível da formação de 3-fosfoglicerato (3PG), com o seguinte rendimento:



[0099] Descendo para a formação de piruvato a partir de 3PG, chegamos ao seguinte balanço:



[00100] A integração das modificações de acordo com a invenção faz com que seja possível recuperar a molécula de carbono de outro modo perdida pela descarboxilação na via das pentoses-fosfato. O rendimento teórico máximo da síntese de piruvato durante a produção de 2 NADPH pela engenharia é, portanto, $0,98 \text{ g}_{\text{piruvato}}/\text{g}_{\text{glicose}}$, o que permite uma melhoria de 20,5% em relação à obtida pela via das pentoses-fosfato.

b) Simulação dos rendimentos de biossíntese por análise

de balanço de fluxo

[00101] Em uma abordagem de bioinformática, análises de balanço de fluxo (FBAs) também foram realizadas para simular o impacto das modificações descritas de acordo com a invenção no rendimento de diferentes vias biossintéticas.

[00102] As FBAs se baseiam em modelos matemáticos que simulam redes metabólicas na escala do genoma (Orth et al., Nat Biotechnol. 2010; 28: 245-248). As redes reconstruídas contêm as reações metabólicas conhecidas de um determinado organismo e integram as necessidades da célula, em particular para garantir a manutenção ou o crescimento das células. As FBAs permitem calcular o fluxo de metabólitos através dessas redes, possibilitando a previsão das taxas teóricas de crescimento bem como o rendimento da produção de metabólitos.

i) Procedimento

[00103] Simulações de FBA foram realizadas com o software OptFlux (Rocha et al., BMC Syst Biol. 2010, 19 de abril; 4: 45. doi: 10.1186/1752-0509-4-45), e o modelo metabólico de *Saccharomyces cerevisiae* IMM904 (Mo et al., BMC Syst Biol. 2009 Mar 25; 3: 37 doi: 10.1186/1752-0509-37). Este modelo foi modificado para incluir as melhorias descritas de acordo com a invenção, incluindo uma via de fixação de CO₂ heteróloga com (i) a adição de uma reação do tipo PRK, (ii) a adição de uma reação do tipo RuBisCO.

[00104] Em modalidades exemplificativas particulares,

as reações necessárias para simular a produção de moléculas através de vias heterólogas foram também adicionadas ao modelo.

[00105] Em uma modalidade exemplificativa particular, foi adicionada uma reação de farneseno sintase (EC 4.2.3.46 ou EC 4.2.3.47) para a produção heteróloga de farneseno.

[00106] Em uma segunda modalidade exemplificativa particular, as reações de acetoacetyl-CoA redutase (EC 1.1.1.36) e poli- β -hidroxibutirato sintase (EC 2.3.1.B2 ou 2.3.1.B5) foram adicionadas ao modelo para simular uma via de produção heteróloga para β -hidroxibutirato, o monômero de poli-hidroxibutirato. As simulações foram realizadas aplicando ao modelo um conjunto de restrições reproduzíveis pelo perito, destinadas a simular as condições de cultura *in vivo* de uma cepa de *S. cerevisiae* sob as condições descritas de acordo com a invenção (por exemplo, presença de glicose não restrita no meio, condição de cultura aeróbica).

[00107] As simulações foram realizadas aplicando ao modelo um conjunto de restrições reproduzíveis pelo perito, destinadas a simular as condições de cultura *in vivo* de uma cepa de *S. cerevisiae* sob as condições descritas de acordo com a invenção (por exemplo, presença de glicose não restrita no meio, condição de cultura aeróbica).

[00108] Em modalidades exemplares particulares, as simulações são realizadas inativando virtualmente as reações

das enzimas transaldolase TAL1 e NQM1, de modo a simular as diminuições na atividade da ramificação não oxidativa da via das pentoses, descritas de acordo com a invenção.

[00109] Simulações são realizadas em paralelo em um modelo do "tipo selvagem" não modificado, a fim de avaliar o impacto das melhorias descritas de acordo com a invenção sobre o rendimento de produção das vias biossintéticas testadas.

ii) Resultados

[00110] Os rendimentos teóricos obtidos e as percentagens de melhoria fornecidas pela invenção são descritos na Tabela 7 abaixo.

Tabela 7: Rendimentos de produção teóricos máximos avaliados por FBA em uma cepa do tipo selvagem e uma cepa modificada de acordo com a invenção, para a produção de diferentes moléculas.

Molécula alvo	Rendimentos de Produção teórica máximos com uma cepa do tipo selvagem			Rendimentos de Produção teórica máximos com uma cepa modificada de acordo com a invenção			Melhoria percentual no rendimento teórico em massa $\frac{g_X}{g_{GLUC}}$ fornecido pela invenção
	Mol_X/Mol_{GLUC}	$CMol_X/CMol_{GLUC}$	g_X/g_{GLUC}	Mol_X/Mol_{GLUC}	$CMol_X/CMol_{GLUC}$	g_X/g_{GLUC}	
Glutamato	0,92	0,77	0,75	1	0,83	0,82	+9,3 %
Ácido β -hidroxibutírico	0,92	0,61	0,53	1	0,67	0,58	+ 9,4 %
Farneseno	0,21	0,54	0,24	0,22	0,56	0,25	+4,2 %

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

$CMol_X/CMol_{GLUC}$: moles de carbono da molécula X

produzidas, em relação aos moles de carbono de glicose consumidos

g_x/g_{GLUC} : g da molécula X produzida, em relação à g de glicose consumida

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

[00111] Uma cepa de levedura de *Saccharomyces cerevisiae*, CEN.PK 1605 (Mat a HIS3 leu2-3,112 trp1-289 ura3-52 MAL.28c) derivada a partir da cepa comercial CEN.PK 113-7D (GenBank: JRIV000000000) foi projetada para produzir NADPH sem perda de CO₂ e, assim, melhorar a produção de farneseno alfa a partir de glicose.

a) Inativação da ramificação não oxidativa da via das pentoses-fosfato

[00112] A ramificação não oxidativa da via das pentoses-fosfato foi inativada pela deleção do gene TAL1 e seu parálogo NQM1.

i) Inativação do gene TAL1: Cromossomo XI (836350 a 837357, cadeia complementar)

[00113] Para esse fim, a fase de codificação do gene de resistência a G418, derivado do cassete KanMX contido no plasmídeo pUG6 (P30114) - Euroscarf, foi amplificada com os oligonucleotídeos Sdtal1-Rdtal1 (Tabela 8).

Tabela 8: Oligonucleotídeos

Nome	sequência
------	-----------

Sdtal1 (SEQ ID N O: 1)	<u>ACGATAGTAAAATACTTCTCGAACTCGTCACATATACGTGTACATA</u> <u>ATGGGTAAGGAAAAGACTCACGTTTC</u>
Rdtal1 (SEQ ID N O: 2)	<u>ATCAAAAGAAACGTGCATAAGGACATGGCCTAAATTAATATTTCCG</u> <u>AGATACTTCCTTAGAAAACTCATCGAGCATCAAATGAAAC</u>
Sdnqm1 (SEQ ID N O: 3)	<u>TTGCTAGCGTAAGTCATAAAAAATAGGAAATAATCACATATATACA</u> <u>AGAAATTAAATATGGGTAAAAAGCCTGAACTCACCG</u>
Rdnqm1 (SEQ ID N O: 4)	<u>AGTGGTATATATATATTTATATATATAAGTAGGTACCTCTACTCTT</u> <u>AATGATTATTCCTTTGCCCTCGGACG</u>

[00114] A porção sublinhada dos Oligonucleotídeos é perfeitamente homóloga à sequência de KanMX e o restante da sequência corresponde às regiões adjacentes à fase de codificação do gene TAL1 no genoma de *Saccharomyces cerevisiae*, de modo a gerar um amplicon de PCR contendo em suas extremidades sequências de recombinação homólogas do locus do gene TAL1.

[00115] Para a reação de transformação, cepa CEN.PK 1605 foi cultivada em um volume de 50 ml de meio de YPD rico complexo (extrato de levedura de peptona de dextrose) a 30 °C, até uma densidade ótica a 600 nm de 0,8. As células foram centrifugadas durante 5 minutos a 2.500 rpm à temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e as células foram ressuspensas em 25 ml de água estéril e novamente centrifugadas durante 5 minutos a 2.500 rpm à temperatura ambiente. Após a remoção do sobrenadante, as células foram ressuspensas em 400 µl de acetato de lítio estéril 100 mM.

[00116] Ao mesmo tempo, um mix de transformação foi

preparado em um tubo de 2 mL da seguinte forma: 250 µL de PEG 50%, 10 µL de DNA "carreador" a 5 mg/mL, 36 µL de acetato de lítio 1 M, 10 µL de Reação de PCR purificada (cassete de deleção) e 350 µL de água.

[00117] As células ressuspensas (50 µL) foram adicionadas à mistura de transformação e incubadas a 42 °C por 40 minutos em banho-maria.

[00118] Após incubação, o tubo foi centrifugado durante 1 minuto a 5.000 rpm à temperatura ambiente e o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas em 2 mL de YPD, transferidas para um tubo de 14 mL e incubadas durante 2 horas a 30 °C a 200 rpm. As células foram então centrifugadas durante 1 minuto a 5.000 rpm à temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e as células foram ressuspensas em 1 mL de água esterilizada e novamente centrifugadas durante 1 minuto e ressuspensas em 100 µL de água esterilizada e espalhadas sobre YPD + 180 µg/mL de G418.

[00119] As colônias obtidas foram genotipadas para validação da deleção do gene TAL1 e referenciadas **EQ-0520 (CEN.PK1605 Δtal1:: kan)**.

ii) Inativação do gene NQM1: Cromossomo VII (580435 a 581436, cadeia complementar)

[00120] A fase de codificação do gene de resistência à higromicina B, derivados a partir do cassete hphMX (loxP-pAgTEF1-hphMX-tAgTEF1-loxP) e contido no plasmídeo pUG75

(P30671) - Euroscarf, é amplificada com os oligonucleotídeos Sdnqm1 e Rdnqm1 (Tabela 8). Isto gera um amplicon de PCR Δ nqm1 contendo nas suas extremidades sequências de recombinação homólogas locus do gene de NQM1 transaldolase.

[00121] Para a reação de transformação, a cepa **EQ-0520 (CEN.PK1605 Δ tal1:: kan)** foi cultivada em um volume de 50 mL de meio de YPD rico complexo (extrato de levedura peptona dextrose) a 30 °C até uma densidade ótica a 600 nm de 0,8. As células foram centrifugadas durante 5 minutos a 2.500 rpm à temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e as células foram ressuspensas em 25 ml de água estéril e novamente centrifugadas durante 5 minutos a 2.500 rpm à temperatura ambiente. Após a remoção do sobrenadante, as células foram ressuspensas em 400 μ l de acetato de lítio estéril 100 mM. Ao mesmo tempo, um mix de transformação foi preparado em um tubo de 2 mL da seguinte forma: 250 μ l de PEG 50%, 10 μ L de DNA "carreador" a 5 mg/mL, 36 μ L de acetato de lítio 1 M, 10 μ L de Reação de PCR purificada (cassete de deleção) e 350 μ L de água.

[00122] As células ressuspensas (50 μ L) foram adicionadas à mistura de transformação e incubadas a 42 °C por 40 minutos em banho-maria. Após incubação, o tubo foi centrifugado durante 1 minuto a 5.000 rpm à temperatura ambiente e o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas em 2 mL de YPD, transferidas para um tubo de 14

mL e incubadas durante 2 horas a 30 °C a 200 rpm. As células foram então centrifugadas durante 1 minuto a 5.000 rpm à temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e as células foram ressuspensas em 1 mL de água estéril e centrifugou-se novamente durante 1 minuto e ressuspensas em 100 µl de água estéril e espalhadas em YPD + 200 µg/ml de higromicina B + 180 µg/mL de G418.

[00123] As colônias obtidas foram genotipadas para a validação da deleção do gene TAL1 e referenciadas **EQ-0521 (CEN.PK1605 $\Delta tal1$:: kan $\Delta nqm1$:: hph)**.

b) Introdução das enzimas PRK/RuBisCO/farneseno sintase

[00124] De modo a criar uma via alternativa à glicólise e permitir que a cepa **EQ-0521 (CEN.PK1605 $\Delta tal1$:: kan $\Delta nqm1$:: hph)** aumente o rendimento de certos produtos metabólicos fixando CO₂, a cepa é modificada para expressar:

- um gene que codifica um PRK de fosforibuloquinase que se insere na via das pentoses-fosfato, consumindo a ribulose-5P para dar a ribulose-1.5bisP e

- um RuBisCO tipo I (com os genes estruturais RbcL e RbcS e as chaperonas RbcX, GroES e GroEL). RuBisCO consome ribulose-1,5bisP e um mol de CO₂ para formar 3-fosfoglicerato

[00125] Para produzir alfa-farneseno, o gene alfa-farneseno sintase (AFS1; número de acesso GenBank AY182241) está ausente da levedura.

Tabela 9: Cassetes de expressão e composição do

plasmídeo

Proteínas	GenBank	Otimização de códon	Promotor	Terminador	ori	Marcador auxotrófico	Plasmídeos		
RbcL	BAD78320.1	Sim	TDH3p	ADH1	2μ	URA3	pFPP45	pL4	
RbcS	BAD78319.1	Sim	TEF1p	PGK1	2μ	URA3	pFPP45	pL4	
RbcX	BAD80711.1	Sim	TEF1p	PGK1	ARS-CEN6	LEU2	pFPP56		
GroES	U00096	No	PGI1p	CYC1	ARS-CEN6	LEU2	pFPP56		
GroEL	AP009048	No	TDH3	ADH1	ARS-CEN6	LEU2	pFPP56		
PRK	BAD78757.1	Sim	Tet-OFF	CYC1	ARS416-CEN4	TRP1	pFPP20		
alfa-farneseno sintase	AY182241	Sim	PGI1p	CYC1	2μ	URA3		pL4	pL5
Esvazi ar			Tet-OFF	CYC1	ARS416-CEN4	TRP1	pCM185		
Esvazi ar					ARS-CEN6	LEU2	pFL36		

[00126] Os sete genes necessários para a engenharia (Tabela 9) foram clonados em três vetores de plasmídeos capazes de replicação autônoma, com origens de replicação compatíveis e cada um carregando um gene para suplementação de diferentes auxotrofias, permitindo a seleção de cepas contendo os três construtos de plasmídeo. Dois destes plasmídeos são de cópia única, com uma origem de replicação Ars/CEN e o terceiro é multicópia com uma origem de 2μ.

[00127] Genes de *Synechococcus elongatus*, tais como RbcL, RbcS, RbcX e PRK (anteriormente descritos em WO 2015107496 A1) e alfa-farneseno sintase de *Malus domestica* (Tippmann et al. Biotechnol Bioeng. 2016 Jan; 113 (1): 72-

81) foram otimizados para o uso de códons em levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

[00128] De acordo com o protocolo descrito anteriormente, a cepa EQ-0521 foi cultivada em um volume de 50 mL de meio de YPD rico complexo a 30 °C e com a seguinte mistura de transformação: 250 µL de PEG 50%, 10 µL de DNA "carreador" a 5 mg/mL, 36 µL de acetato de lítio 1 M, 10 µL (3 µg de uma combinação de pFPP45 + pFPP56 + pFPP20 ou pL4 + pFPP56 + pFPP20 ou pL5 + pFL36 + pCM185) e 350 µL de água.

[00129] As células ressuspensas (50 µL) foram adicionadas à mistura de transformação e incubadas a 42 °C por 40 minutos em banho-maria. Após incubação, o tubo foi centrifugado durante 1 minuto a 5.000 rpm à temperatura ambiente e o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas em 2 mL de YNB (levedura sem base de nitrogênio suplementada com sulfato de amônio¹, glicose) suplementada com um meio comercial CSM (MP Biomedicals) adequado para marcadores de seleção, transferida para um tubo de 14 mL e incubada durante 2 horas a 30 °C. A mistura final é espalhada em YNB + sulfato de amônio + CSM - LUW (leucina uracila, triptofano em 20 g/L de glicose e 2 µg/mL de doxiciclina).

[00130] As cepas obtidas são:

- EQ-0523 (CEN.PK1605 $\Delta tal1::kan$ $\Delta nqm1::hph$)
(pFPP45+pFPP56+pFPP20)
- EQ-0524 (CEN.PK1605 $\Delta tal1::kan$ $\Delta nqm1::hph$)
(pL4+pFPP56+pFPP20)

- **EQ-0525 (CEN.PK1605) (pL5+pFL36+pCM185)**

[00131] As cepas **EQ-0523** (PRK/RuBisCO/ Δ tal1 :: kan Δ nqm1 :: hph), **EQ-0524** (PRK/RuBisCO/ Δ tal1 :: kan Δ nqm1 :: hph + farneseno sintase) e **EQ-0525** (farneseno sintase) para crescimento em meio líquido YNB com 20 g/L de glicose e 10% de CO₂

[00132] Culturas em lote em frascos Erlenmeyer são realizadas com o meio de cultura apropriado e um fornecimento de CO₂ exógeno a 10%, em incubadora com agitação (120 rpm, 30 °C), com uma inoculação a 0,05 OD_{600nm} medido usando um espectrofotômetro EON (BioTek Instruments). A cepa de interesse é cultivada em meio YNB + CSM-LUW com 20 g/L de glicose e 10% de suprimento de CO₂ exógeno.

[00133] Após observação de um início de crescimento significativo, as cepas são adaptadas a um meio mineral mínimo livre de aminoácidos e base nitrogenada incluída no CSM-LUW, ou seja, apenas YNB com 20 g/L de glicose e 10% de CO₂ exógeno c) *Produção de farneseno em frascos Erlenmeyer.*

[00134] A cepa *Saccharomyces cerevisiae* EQ-0524, cuja ramificação não oxidativa da via das pentoses-fosfato é inibida pela inibição dos genes TAL1 e NQM1, é cultivada de modo a produzir farneseno por superprodução de NADPH sem perda de CO₂, utilizando PRK e RuBisCO exógenos. Esta cepa de interesse é comparada com uma cepa de referência EQ-0525

produzindo farneseno após a adição de uma farneseno sintase heteróloga, sem deleção de TAL1 e NQM1 ou adição de PRK e RuBisCO exógenos. As culturas em modo de lote em frascos Erlenmeyer são realizadas nas condições descritas acima.

[00135] A concentração de farneseno é quantificada a partir do sobrenadante do mosto de fermentação. Resumidamente, as suspensões de células são centrifugadas a 5000 rpm durante 5 minutos. A fase do dodecano é diluída 10 vezes em hexano e injetada na GC-MS, para análise de acordo com o protocolo descrito em Tippman et al. (Biotechnol Bioeng. 2016; 1131: 72-81).

[00136] Um aumento de 3% no rendimento da produção, em gramas de farneseno por grama de glicose consumida, foi observado na cepa EQ-0253, comparado com a cepa EQ-0253

Exemplo 3: Melhoria da produção de glutamato em *E. coli*

[00137] Já foi descrito que a deleção do gene da alfa-cetoglutarato desidrogenase aumenta a produção de glutamato (Usuda et al., J Biotechnol. 2010, 3 de maio; 147 (1): 17-30. doi: 10.1016/j.jbiotec.2010.02.018). As experiências descritas abaixo foram, portanto, realizadas em uma cepa MG1655 de *Escherichia coli* K12, cujo gene *sucA* foi eliminado. Esta cepa é derivada de um banco de deleção de genes (Baba et al., Mol Syst Biol. 2006; 2: 2006.0008) em *Escherichia coli* e fornecido pelo Coli Genetic Stock Center sob o nome JW0715-2 e com referência 8786. (JW0715- 2: MG1655 Δ sucA ::

Kan) .

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

[00138] Para ser capaz de reutilizar a mesma estratégia de deleção usada para construir a cepa JW0715-2 acima, o cassete de seleção teve que ser removido, usando uma recombinase.

[00139] O plasmídeo p707-Flpe (fornecido no kit de recombinação Quick & Easy *E. coli* Gene Deletion Red®/ET® por Gene Bridges) é sujeito a eletroporação de acordo com o protocolo do kit. As células são selecionadas em LB ágar suplementado com 0,2% de glicose, 0,0003% de tetraciclina e adicionadas com 0,3% de L-arabinose. Uma contra seleção dos clones obtidos é realizada pela verificação de que eles não são mais capazes de crescer no mesmo meio suplementado com 0,0015% de canamicina.

[00140] A cepa obtida é chamada **EQ.EC002: MG1655 Δ sucA**

b) Deleção do operon *edd-eda*, codificando a via metabólica Entner-Doudoroff

[00141] A deleção do operon *edd-eda* é realizada por recombinação homóloga e uso do Kit de Recombinação Quick & Easy *E. coli* Gene Deletion Red®/ET® (Gene Bridges) de acordo com o protocolo do fornecedor.

1. Oligonucleotídeos projetados para amplificar um cassete de expressão do gene de resistência FRT-PKG-gb2-neo-

FRT e tendo uma sequência 5' homóloga, com mais de 50 nucleotídeos, para as regiões adjacentes do locus de deleção (posições 1932065-1932115 e 1934604-1934654) no cromossoma, gerando assim braços de recombinação do cassete no genoma bacteriano de cada lado de todo o operon;

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

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

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

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

5. A cepa obtida é chamada **EQ.EC003: MG1655 Δ sucA Δ edd-eda**

c) Deleção do gene *talA*

[00142] A deleção do gene *talA* é realizada por recombinação homóloga e pelo uso do Kit de Recombinação Quick & Easy *E. coli* Gene Deletion Red®/ET® (Gene Bridges) de acordo com o protocolo do fornecedor.

1. Oligonucleotídeos projetados para amplificar um cassete de expressão do gene de resistência FRT-PKG-gb2-neo-FRT e tendo uma sequência 5' homóloga de 50 nucleotídeos às regiões adjacentes do locus de deleção, ou seja, a fase de codificação do gene (*talA*) (Gene ID: 947006), gerando assim braços de recombinação do cassete no genoma bacteriano.

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

3. Transformação do amplicon obtido na primeira etapa, na presença da RedET recombinase, que será induzida por 0,3% de arabinose em LB líquido por 1 h. Para esse fim, é realizada uma segunda eletroporação das células que expressam RedET pelo cassete de deleção e as colônias são selecionadas em LB

ágar suplementado com 0,2% de glicerol e 0,3% de piruvato, 0,0003% de tetraciclina e adicionado com 0,3% de L-arabinose e 0,0015% canamicina.

[00143] As deleções são verificadas por genotipagem e sequenciamento e o nome das cepas obtidas são:

- EQ.EC002: MG1655 Δ sucA
- EQ.EC003: MG1655 Δ sucA Δ edd-eda
- EQ.EC020: MG1655 Δ sucA Δ edd-edda Δ talA::kan

d) Inserção de engenharia de PRK/RuBisCO para fixação de CO₂

[00144] Para a expressão recombinante dos diferentes componentes de um RuBisCO tipo I em *E. coli*, os genes descritos na Tabela abaixo são clonados como um operon sintético contendo os genes descritos na Tabela abaixo.

[00145] Para controlar o nível de expressão desses genes, as sequências de ligação ao ribossomo (RBS) apresentadas na Tabela, com diferentes eficiências de tradução, como descrito em Zelcbuch et al. (Zelcbuch et al., Nucleic Acids Res. 2013 May; 41 (9): e98; Levin-Karp et al., ACS Synth Biol. 2013 Jun 21; 2 (6): 327-36. doi: 10.1021/sb400002n) são inseridos entre a fase de codificação de cada gene. A sucessão de cada fase de codificação intercalada por uma sequência RBS é construída por inserção sucessiva em um vetor pZA11 (Expressys) que contém um

promotor PLtetO-1, uma origem de replicação p15A e um gene de resistência à ampicilina.

Tabela 10: Referências genéticas

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

Tabela 11: Composição dos cassetes de expressão em plasmídeos

Plasmídeo	Estrutura do operon sintético no vetor pZA11								
	geneA	RBS1	geneB	RBS2	geneC	RBS3	geneD	RBS4	geneE
pZA11									
pEQEC005	rbcS	D	rbcL	B	RbcX	F			
pEQEC006	rbcS	D	rbcL	B	RbcX	F	Prk		
pEQEC008	Prk								

Tabela 12: Sequências intercistrônicas do sítio de ligação ao ribossoma (RBS)

Nome	Sequências RBS
A (SEQ ID NO: 5)	AGGAGGTTTGGA
B (SEQ ID NO: 6)	AACAAAATGAGGAGGTACTGAG
C (SEQ ID NO: 7)	AAGTTAAGAGGCAAGA
D (SEQ ID NO: 8)	TTTCGAGGGGGAAG
E (SEQ ID NO: 9)	TAAGCAGGACCGGCGGCG
F (SEQ ID NO: 10)	CACCATACACTG

[00146] Várias cepas são produzidas por eletroporação dos diferentes vetores apresentados de acordo com o plano acima:

EQ.EC 020 → (EQ.EC 003+ pZA11): MG1655 Δ sucA Δ edd-eda

EQ.EC 021 → (EQ.EC 004+ pEQEC005): MG1655 Δ sucA Δ edd-eda -talA::kan (RuBisCO)

EQ.EC 022 → (EQ.EC 004+ pEQEC006): MG1655 Δ sucA Δ edd-eda talA::kan (RuBisCO+PRK)

EQ.EC 024 → (EQ.EC 003+ pEQEC008): MG1655 Δ sucA Δ edd-eda Δ talA::kan (PRK)

[00147] Os clones são selecionados em meio LB suplementado com 100 mg/L de ampicilina. Após a obtenção de uma quantidade suficiente de biomassa, culturas com volume maior ou igual a 50 mL em frascos Erlenmeyer de pelo menos 250 mL são inoculadas para adaptar a deformação ao uso da engenharia de PRK/RuBisCO. Esta adaptação é realizada em meio de cultura LB com 2 g/l de glicose e um fornecimento de CO₂ exógeno de 1 atmosfera a 37 °C como descrito acima.

e) Produção de glutamato

[00148] Para a produção de glutamato, células de 500 mL de cultura LB são inoculadas em 20 mL de meio MS (40 g/L de glicose, MgSO₄⁴⁻.7H₂O 1 g/L, (NH₄)₂SO₄ 20 g/L, KH₂PO₄ 1 g/L, 10 mg/L de FeSO₄.7H₂O, 10 mg/L de MnSO₄.7H₂O, 2 g/L de extrato de levedura, 30 g/L de CaCO₃, 100 mg/L de ampicilina a uma pressão de 0,1 atmosfera de CO₂.

[00149] O glutamato residual e a glicose são medidas com um bioanalizador (Sakura Seiki). O rendimento de carbono Y_{p/s} é calculado em gramas de glutamato produzido por grama

de glicose consumida. Este rendimento aumenta em 8% nas cepas EQ.EC 022 (RuBisCO + PRK), comparado com as cepas de controle EQ.EC 020 (vazio), EQ.EC 021 (apenas RuBisCO). A cepa de controle EQ.EC 024 (apenas PRK) não é viável.

Exemplo 4: Melhoria da produção de PHB em *C. necator*

a) Inibição da ramificação não oxidativa da via das pentoses-fosfato

[00150] Aumentar o poder redutor também pode melhorar significativamente a eficiência das vias metabólicas existentes. Este é o caso da cepa bacteriana *Ralstonia eutropha* ATCC 17699 (*Cupriavidus necator*) que produz naturalmente poli-hidroxibutirato (PHB). Esta bactéria é capaz de se desenvolver sob condições autotróficas e heterotróficas.

[00151] A deleção, de acordo com a invenção, do gene *tal* (Transaldolase MF_00492) torna possível concentrar o fluxo metabólico na via das pentoses-fosfato oxidativas, aumentando o pool de nucleotídeos reduzidos por NADPH, aumentando assim o rendimento da produção de PHB, mas também permitindo o uso da via da glicólise.

[00152] Esta cepa de *Cupriavidus necator* (*R. eutropha* H16) possui um megaplasmídeo pHG1 e dois cromossomos. A deleção do gene *tal* é conseguida gerando um vetor contendo um gene suicida *SacA* para bactérias Gram-negativas, como descrito em Quandt et al. e Lindenkamp et al. (Quandt et

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

[00153] Dois amplicons de PCR correspondentes a regiões adjacentes do gene *tal* são clonados por restrição de acordo com o procedimento descrito em Lindenkamp et al. (Appl Environ Microbiol. ago. 2012; 78 (15): 5375-83) no plasmídeo pJQ200mp18Tc. O plasmídeo modificado pJQ200mp18Tc:: Δ tal é então transformado em uma cepa de *E. coli* S17-1, pelo método de transformação do cloreto de cálcio. E a transferência de material genético é feita por conjugação, depositando em agar uma mancha da cultura de *Ralstonia Eutropha* em uma placa contendo uma monocamada de células da bactéria S17-1 e a seleção é feita em meio de caldo nutriente (NT) a 30 °C, na presença de 10% de sacarose para efeitos de seleção (Hogrefe et al., J Bacteriol. 1984 Apr; 158 (1): 43-8) e validada em um meio mineral contendo 25 µg/mL de tetraciclina.

[00154] As deleções são validadas por genotipagem e sequenciamento. A cepa resultante EQCN_002 tem, portanto, uma deleção do gene *tal* **EQCN_010: H16 Δ tal**

b) Inativação da via metabólica Entner-Doudoroff

[00155] Dois amplicons de PCR correspondentes às regiões adjacentes dos genes *edd* e *eda* (à montante de *edd* e à jusante de *eda*) são clonados por restrição de acordo com

o procedimento descrito em Srinivasan et al. (Appl Environ Microbiol. 2002 Dec; 68 (12): 5925-32) no plasmídeo *pJQ200mp18Cm*.

[00156] O plasmídeo modificado *pJQ200mp18Cm* :: Δ edd-eda é então transformado em uma cepa de *E. coli* S17-1, pelo método de transformação de cloreto de cálcio. E a transferência do material genético é feita por conjugação, depositando em agar uma mancha de cultura de *Ralstonia eutropha* **EQCN_010** em uma placa contendo uma monocamada de células de bactérias S17-1 e a seleção é feita em meio de caldo de nutriente (NT) a 30 °C, na presença de sacarose a 10% para efeitos de seleção (Hogrefe et al, J Bacteriol abril de 1984; 158 (1): 43-8.) e validada em meio mineral contendo 50 µg/ml de cloranfenicol.

[00157] As deleções são validadas por genotipagem e sequenciamento. A cepa resultante **EQCN_003** tem, portanto, uma deleção do gene *tal* **EQCN_011: H16 Δ tal Δ edd-eda**

c) Produção de PHB em um biorreator

[00158] O inóculo de um caldo congelado é espalhado em um meio sólido a uma taxa de 50 a 100 µL a partir de um criotubo incubado a 30 °C por 48 a 96 h na presença de glicose. A expressão de genes que codificam RuBisCO e PRK são mantidas em *C. necator* em condições aeróbicas heterotróficas (Rie Shimizu et al, Sci Rep 2015; 5: 11617. Publicado online em 1 de julho de 2015). Culturas em modo de

lote em frascos Erlenmeyer (10 mL em 50 mL, depois 50 mL em 250 mL) são transportadas com o meio de cultura apropriado, em glicose 20 g/L e 10% de CO₂ exógeno em uma incubadora de agitação (100-200 rpm, 30 °C), com uma inoculação mínima de 0,01 OD_{620nm}.

[00159] A cepa de interesse EQCN_011 melhorar o rendimento da produção de PHB é comparada com uma cepa de referência H16 naturalmente acumulando PHB sob condições heterotróficas na presença de uma limitação nutricional.

[00160] A produtividade das cepas é comparada em biorreatores. Culturas realizadas em biorreatores são semeadas a partir de cadeias de amplificação sólidas e/ou líquidas em frascos de Erlenmeyer, nas condições descritas acima. Os biorreatores, do tipo My-control (Applikon Biotechnology, Delft, Holanda) 750 mL ou Biostat B (Sartorius Stedim, Gtingen, Alemanha) 2,5 L, são semeados a uma concentração mínima equivalente a 0,01 OD_{620nm}.

[00161] O acúmulo de PHB é desacoplado do crescimento. A cultura é regulada a 30 °C, o arejamento é mantido entre 0,1 VVM (volume de gás/volume de líquido/min) e 1 VVM, a fim de manter uma concentração mínima de oxigênio dissolvido acima de 20% (30 °C, 1 bar). A agitação é adaptada de acordo com a escala do biorreator usados. O fluxo de gás de entrada consiste em ar opcionalmente suplementado com CO₂. A suplementação de CO₂ está entre 1% e 10%. O pH é ajustado

para 7 adicionando uma solução de amônia a 14% ou 7%. O método de cultura alimentada em lote permite um suprimento de substrato de carbono não limitante combinado com uma limitação de fósforo ou nitrogênio, enquanto mantém uma relação carbono/fósforo ou carbono/nitrogênio constante.

[00162] Extração e quantificação de PHB são realizadas de acordo com o método de Brandl et al. (Appl Environ Microbiol. 1988 Ago; 54 (8): 1977-82).

[00163] O protocolo consiste na adição de 1 mL de clorofórmio a 10 mg de células liofilizadas, seguido de 850 µL de metanol e 150 µL de ácido sulfúrico. A mistura é aquecida por 2,5 horas a 100 °C, resfriada e 500 µL de água são adicionados. As duas fases são separadas por centrifugação e a fase orgânica é seca por adição de sulfato de sódio.

[00164] As amostras são filtradas e analisadas conforme descrito por Müller et al. (Appl Environ Microbiol. 2013 Jul; 79 (14): 4433-9). A comparação das culturas de *C. necator* **H16 do tipo selvagem** e da cepa **EQCN_011: H16 Δ tal Δ edd-eda**, respectivamente, mostra um aumento de 2% no rendimento de produção de PHB (em gramas de PHB por grama de glicose consumida) em favor da cepa modificada de acordo com a invenção.

REIVINDICAÇÕES

1. Microrganismo geneticamente modificado **caracterizado** pelo fato de que expressa uma enzima RuBisCO funcional e uma fosforibuloquinase funcional (PRK), e no qual a ramificação não oxidativa da via das pentoses-fosfato é pelo menos parcialmente inibida, o referido microrganismo é geneticamente modificado de modo a produzir uma molécula exógena de interesse e/ou superproduzir uma molécula endógena de interesse, que não seja uma enzima RuBisCO e/ou fosforibuloquinase (PRK).

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

3. Microrganismo geneticamente modificado, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado** pelo fato de que o referido microrganismo é geneticamente modificado para inibir a ramificação não oxidativa da via das pentoses-fosfato a jusante de produção de ribulose-5-fosfato.

4. Microrganismo geneticamente modificado, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, **caracterizado** pelo fato de que a expressão do gene que codifica para uma transaldolase (E.C.2.2.1.2) e/ou uma transcetolase (E.C.2.2.1.1) é pelo menos parcialmente inibida.

5. Microrganismo geneticamente modificado, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, **caracterizado** pelo fato de que a molécula exógena de interesse e/ou a molécula endógena de interesse é selecionada de entre aminoácidos, peptídeos, proteínas, vitaminas, esteróis, flavonóides, terpenos, terpenóides, ácidos graxos, polióis e ácidos orgânicos.

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

7. Microrganismo geneticamente modificado, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, **caracterizado** pelo fato de que o referido microrganismo é uma levedura do gênero *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada para expressar uma RuBisCO funcional do tipo I ou II e uma fosforibuloquinase funcional (PRK), e em que a expressão do TAL1 e/ou dos genes NQM1 é pelo menos parcialmente inibida.

8. Uso de um microrganismo geneticamente modificado conforme definido em qualquer uma das reivindicações anteriores **caracterizado** pelo fato de ser para a produção ou superprodução de uma molécula de interesse, que não seja uma

enzima RuBisCO e/ou uma fosforibuloquinase (PRK), e preferencialmente selecionada a partir de amino ácidos, peptídeos, proteínas, vitaminas, esteróis, flavonóides, terpenos, terpenóides, ácidos graxos, polióis e ácidos orgânicos.

9. Processo biotecnológico para a produção de pelo menos uma molécula de interesse que não seja uma enzima RuBisCO e/ou uma fosforibuloquinase (PRK), **caracterizado** pelo fato de compreender uma etapa de cultivar um microrganismo geneticamente modificado conforme descrito em qualquer uma das reivindicações de 1 a 8, em condições que permitam a síntese ou bioconversão, pelo referido microrganismo, da referida molécula de interesse e, opcionalmente, uma etapa de recuperação e/ou purificação da referida molécula de interesse.

10. Processo biotecnológico, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** pelo fato de que o microrganismo é geneticamente modificado para expressar pelo menos uma enzima envolvida na bioconversão ou na síntese da referida molécula de interesse.

11. Processo biotecnológico, de acordo com a reivindicação 9 ou 10, **caracterizado** pelo fato de que o microrganismo é geneticamente modificado para inibir pelo menos parcialmente uma enzima envolvida na degradação da referida molécula de interesse.

12. Processo para a produção de uma molécula de interesse que não seja uma enzima RuBisCO e/ou uma fosforibuloquinase (PRK), **caracterizado** pelo fato de compreender (i) inserir pelo menos uma sequência que codifica uma enzima envolvida na síntese ou bioconversão da referida molécula de interesse em um microrganismo recombinante conforme descrito em qualquer uma das reivindicações de 1 a 8, (ii) cultivar o referido microrganismo em condições que permitam a expressão da referida enzima e, opcionalmente, (iii) recuperar e/ou purificar a referida molécula de interesse.

13. Processo para a produção de uma molécula de interesse que não seja uma enzima RuBisCO e/ou uma fosforibuloquinase (PRK), **caracterizado** pelo fato de compreender (i) a inibição da expressão de, pelo menos, um gene que codifica uma enzima envolvida na degradação da referida molécula de interesse em um microrganismo recombinante conforme descrito em qualquer uma das reivindicações de 1 a 8, (ii) cultivar o referido microrganismo em condições que permitam a expressão da referida enzima e, opcionalmente, (iii) recuperar e/ou purificar a referida molécula de interesse.

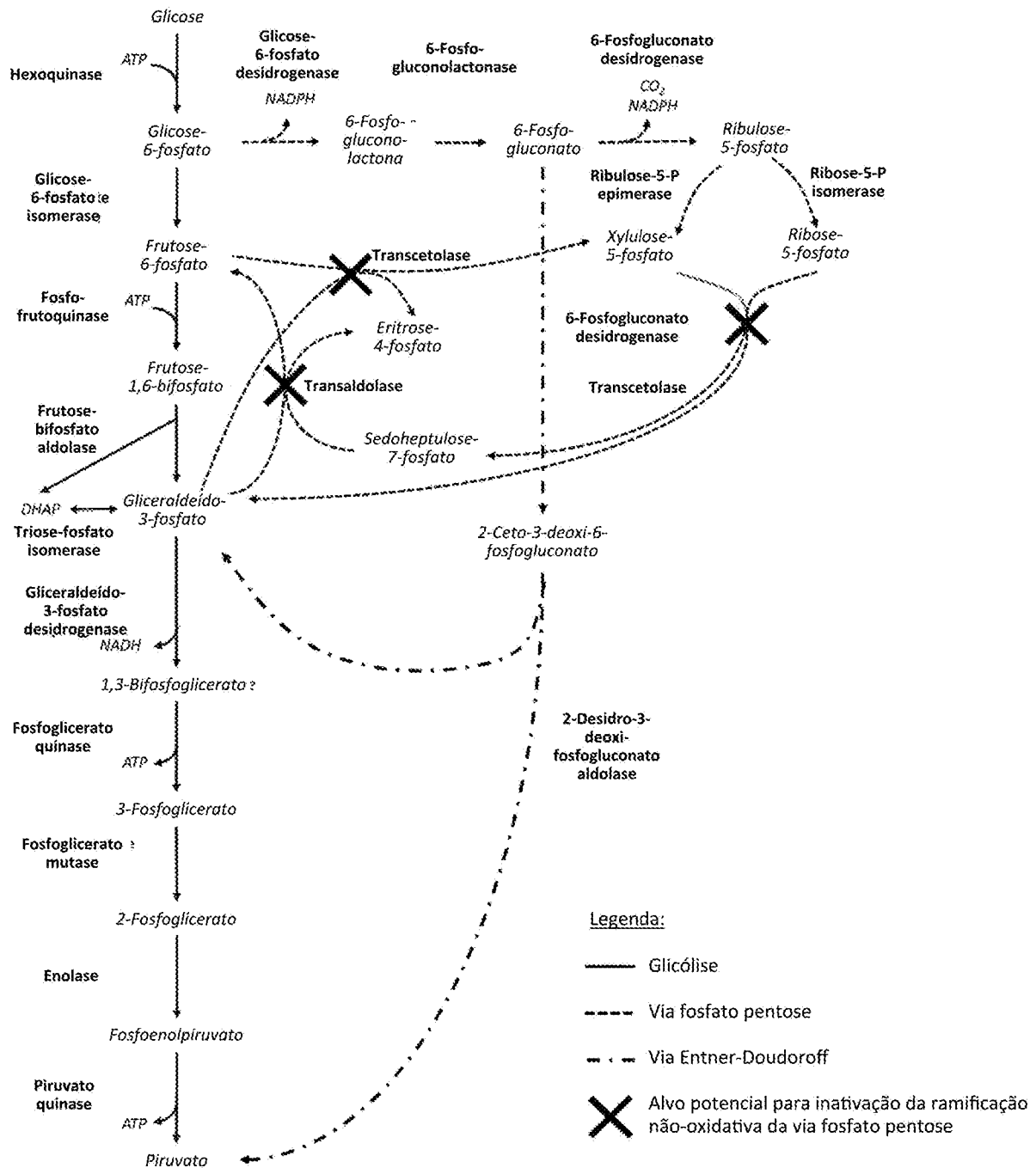


FIGURA 1

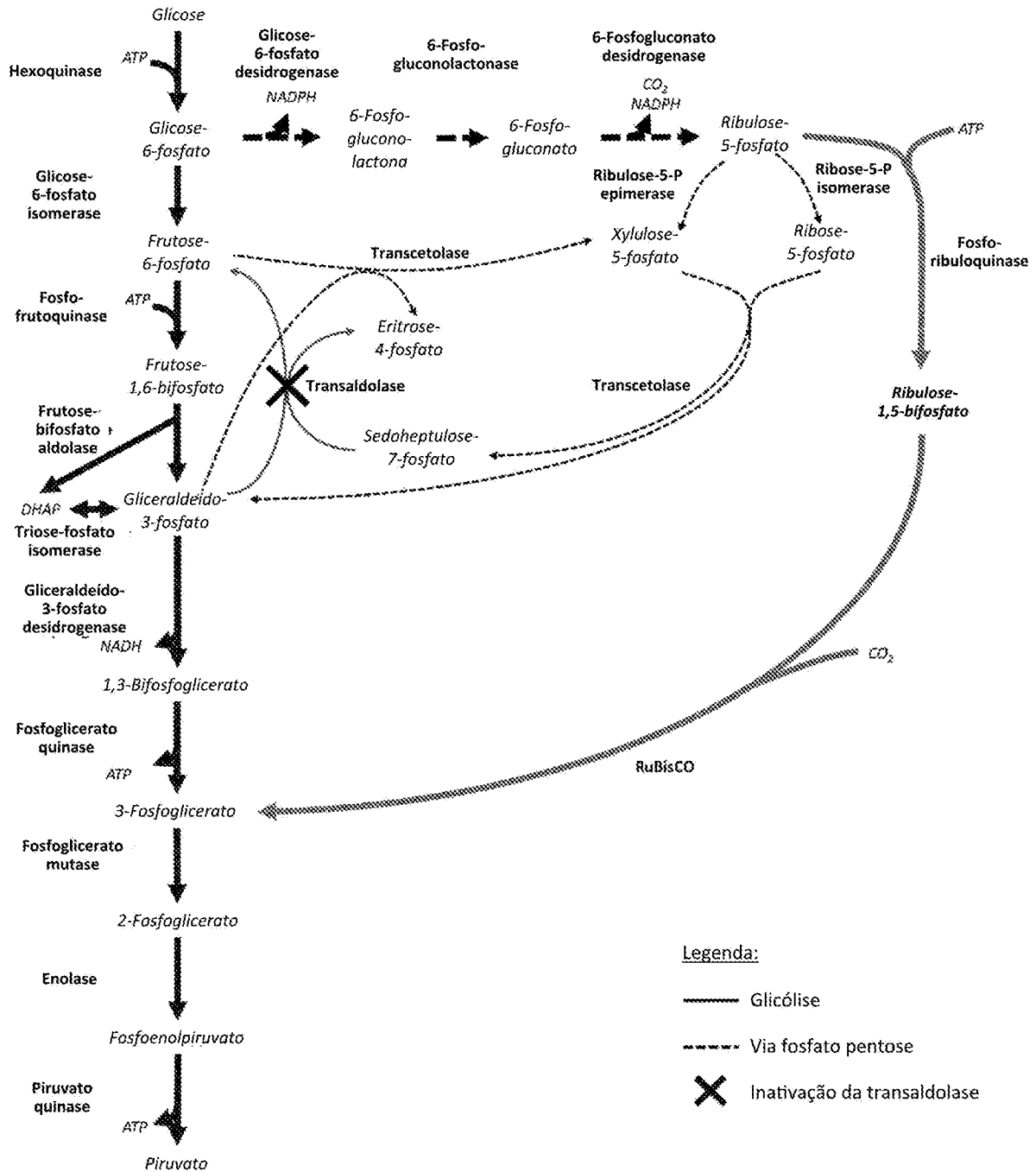


FIGURA 2

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

A invenção se refere a um microrganismo geneticamente modificado expressando uma enzima RuBisCO funcional tipo I ou II e uma fosforibulocinase funcional (PRK), e no qual a ramificação não oxidativa da via das pentoses-fosfato é pelo menos parcialmente inibida, sendo o referido microrganismo geneticamente modificado para produzir uma molécula exógena e/ou para superproduzir uma molécula endógena. A invenção também diz respeito ao uso de tal microrganismo geneticamente modificado para a produção ou superprodução de uma molécula de interesse e processos para a síntese ou bioconversão de moléculas de interesse.

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

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: Listagem de Sequencias F.12.009.PI-BR.txt
- Data de Geração do Código: 20/09/2019
- Hora de Geração do Código: 16:25:31
- Código de Controle:
 - Campo 1: 73BA4BB47D710784
 - Campo 2: B0378A4EF716DF7C