

Aviso

Esta tradução foi gerada por uma máquina. Não é garantido que esta seja inteligível, exata, completa, confiável ou apropriada para fins específicos. Decisões críticas, como importantes decisões comerciais ou financeiras, não devem ser tomadas baseadas no resultado de uma tradução feita por máquina.

DESCRIÇÃO US5000000A

□

¹⁴ DESCRIÇÃO

¹⁵ Antecedentes da invenção

¹⁶ Durante a glicólise, as células convertem açúcares simples, como glicose, em ácido pirúvico, com uma produção líquida de ATP e NADH. Na ausência de um sistema de transporte de elétrons funcional para fosforilação oxidativa, pelo menos 95% do ácido pirúvico é consumido em vias curtas que regeneram NAD⁺, um requisito obrigatório para a glicólise contínua e produção de ATP. Os produtos residuais desses sistemas de regeneração de NAD⁺ são comumente chamados de produtos de fermentação.

²² Os microrganismos são particularmente diversos na gama de produtos de fermentação produzidos por diferentes gêneros (Krieg, N. R. e J. G. Holt, eds. [1984] Manual de Bacteriologia Sistemática de Bergey. (A Williams & Wilkins Co., Baltimore). Esses produtos incluem ácidos orgânicos, como lactato, acetato, succinato e butirato, bem como produtos neutros, como etanol, butanol, acetona e butanodiol. Na verdade, a diversidade de produtos de fermentação de bactérias levou ao seu uso como um determinante primário na taxonomia (Krieg e Holt [1984], supra).

²⁹ Os produtos finais da fermentação compartilham diversas características fundamentais. Eles são relativamente atóxicos nas condições em que são produzidos inicialmente, mas se tornam mais tóxicos com o acúmulo. Eles são mais reduzidos que o piruvato porque seus precursores imediatos serviram como aceptores terminais de elétrons durante a glicólise. A produção microbiana desses produtos de fermentação constitui a base das nossas aplicações mais antigas e economicamente bem-sucedidas da biotecnologia e inclui laticínios, carnes, bebidas e combustíveis. Nos últimos anos, muitos avanços foram feitos no campo da biotecnologia como resultado de novas tecnologias que permitem aos pesquisadores alterar seletivamente a composição genética de alguns microrganismos.

- ³⁸ *Escherichia coli* é um importante veículo para a clonagem e modificação de genes para biotecnologia e é um dos hospedeiros mais importantes para a produção de produtos recombinantes. Nos últimos anos, a gama de hospedeiros usados para pesquisa de DNA recombinante foi ampliada para incluir uma variedade de bactérias, leveduras, fungos e algumas células eucarióticas. A invenção aqui descrita se refere ao uso da tecnologia de DNA recombinante para induzir a produção de produtos úteis específicos por um hospedeiro modificado.
- ³⁸ O DNA usado para modificar o hospedeiro da invenção em questão é isolado de *Zymomonas mobilis*. *Z. mobilis* é um microrganismo com características metabólicas incomuns que é comumente encontrado em seivas de plantas e no mel. O *Z. mobilis* tem servido há muito tempo como um inóculo natural para a fermentação da seiva da agave para produzir pulque (uma bebida mexicana que contém álcool) e como inóculo para vinhos de palma. Este organismo também é usado para produção de etanol combustível e foi relatado como capaz de atingir taxas de produção de etanol substancialmente maiores do que as de leveduras.
- ⁵² Embora *Z. mobilis* seja nutricionalmente simples e capaz de sintetizar aminoácidos, nucleotídeos e vitaminas, a gama de açúcares metabolizados por este organismo é muito limitada e normalmente consiste em glicose, frutose e sacarose. A fosforilação no nível do substrato da fermentação desses açúcares é a única fonte de energia para a biossíntese e a homeostase. *Z. mobilis* é incapaz de crescer mesmo em meio rico, como caldo nutritivo, sem açúcar fermentável.
- ⁵⁸ *Z. mobilis* é uma bactéria obrigatoriamente fermentativa que não possui um sistema funcional para fosforilação oxidativa. Este organismo, assim como *Saccharomyces cerevisiae*, produz etanol e dióxido de carbono como principais produtos de fermentação. *Z. mobilis* produz etanol por um caminho curto que requer apenas duas atividades enzimáticas: piruvato descarboxilase e álcool desidrogenase. A piruvato descarboxilase é a enzima chave nessa via que desvia o fluxo de piruvato para o etanol. A piruvato descarboxilase catalisa a descarboxilação não oxidativa do piruvato para produzir acetaldeído e dióxido de carbono. Duas isoenzimas de álcool desidrogenase estão presentes neste organismo e catalisam a redução de acetaldeído a etanol durante a fermentação, acompanhada pela oxidação de NADH a NAD⁺. Embora as álcool desidrogenases bacterianas sejam comuns em muitos organismos, poucas bactérias possuem piruvato descarboxilase. Tentativas de modificar *Z. mobilis* para aumentar sua utilidade comercial como produtor de etanol tiveram sucesso muito limitado.
- ⁷⁰ A maior parte do etanol combustível é atualmente produzida a partir de açúcares hexose em amido de milho ou xarope de cana, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* ou *Zymomonas mobilis*. No entanto, essas são fontes relativamente caras de açúcares de biomassa e têm valor competitivo como alimentos. Amidos e açúcares representam apenas uma fração do total de carboidratos nas plantas. As formas dominantes de carboidratos vegetais em caules, folhas, cascas, espigas, etc. são os polímeros estruturais da parede, celulose e hemicelulose. A hidrólise desses polímeros libera uma mistura de açúcares neutros que incluem glicose, xilose, manose, galactose e arabinose. Não foi encontrado na natureza nenhum organismo capaz de metabolizar esses açúcares de forma rápida e eficiente em etanol ou qualquer outro produto de valor.

- ⁸⁰ Os genes que codificam a álcool desidrogenase II e a piruvato descarboxilase em *Z. mobilis* foram clonados, caracterizados e expressos separadamente em *E. coli* (Brau, B. e H. Sahm [1986] Arch. Microbiologia. 146:105-110; Brau, B. e H. Sahm [1986] Arch. Microbiologia. 144:296-301; Conway, T., Y. A. Osman, J. I. Konnan, E. M. Hoffmann e L. O. Ingram [1987] J. Bacteriol. 169:949-954; Conway, T., G. W. Sewell, Y. A. Osman e L. O. Ingram [1987] J. Bacteriol. 169:2591-2597; Neale, A. D., R. K. Scopes, R. E. H. Wettenhall e N. J. Hoogenraad [1987] Ácido Nucleico. Resolução 15:1753-1761; Ingram, L. O. e T. Conway [1988] Appl. Meio ambiente. Microbiologia. 54:397-404; Ingram, L. O., T. Conway, D. P. Clark, G. W. Sewell e J. F. Preston [1987] Appl. Meio ambiente. Microbiologia. 53:2420-2425).
- ⁸⁰ Brau e Sahm (Brau, B. e H. Sahm [1986] Arch. Microbiol. 144:296-301) demonstrou pela primeira vez que a produção de etanol poderia ser aumentada em *E. coli* recombinante pela superexpressão da piruvato descarboxilase de *Z. mobilis*, embora concentrações muito baixas de etanol tenham sido produzidas. Estudos subsequentes de Tolan e Finn ampliaram este trabalho usando duas outras bactérias entéricas (*Erwinia chrysanthemi*, Tolan, J. S. e R. K. Finn [1987] Appl. Meio ambiente. Microbiologia. 53:2033-2038; *Klebsiella planticola*, Tolan, J. S. e R. K. Finn [1987] Appl. Meio ambiente. Microbiol. 53:2039-2044) e alcançaram níveis mais elevados de etanol a partir de hexoses, pentoses e misturas de açúcar. A invenção em questão se refere à criação e expressão de um novo operon que codifica um sistema eficiente de produção de etanol. Este novo operon pode ser usado para transformar microrganismos a fim de conferir aos micróbios transformados a capacidade de produzir etanol em quantidades úteis. Os inventores não conhecem nenhum estado da técnica que revele a combinação bem-sucedida de genes de diferentes organismos, sob diferentes sistemas de controle, em um operon sob um sistema de controle comum.
- ¹⁰³ BREVE RESUMO DA INVENÇÃO
- ¹⁰⁴ A invenção descrita aqui diz respeito à construção de um operon portátil exclusivo para produção de etanol que inclui as atividades de álcool desidrogenase II e piruvato descarboxilase da via etanologênica. Este operon exclusivo, denominado operon pet, contém os dois genes necessários para a produção de etanol. Este sistema é capaz de desviar efetivamente o piruvato para o etanol durante o crescimento em condições aeróbicas e anaeróbicas.
- ¹¹⁰ Também são descritas aqui novas cepas de *E. coli* que contêm operons produtores de etanol. Essas linhagens recombinantes demonstram a característica surpreendente e vantajosa de formar colônias maiores em placas contendo açúcares. Além disso, essas cepas recombinantes crescem até densidades celulares sete vezes maiores em cultura em lote. Assim, a invenção aqui descrita pode ser utilizada para aumentar o crescimento e o rendimento de microrganismos recombinantes produtores de qualquer produto.
- ¹¹⁶ BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS
- ¹¹⁷ FIG. 1 mostra a construção de pLOI295 contendo genes que codificam piruvato descarboxilase e álcool desidrogenase II de *Zymomonas mobilis*.
- ¹¹⁹ A FIG. 2 mostra vários plasmídeos contendo os genes que codificam a piruvato descarboxilase e a álcool desidrogenase II de *Zymomonas mobilis*. As abreviações usadas na FIG. 2 são as seguintes: RI, EcoRI; H, HindIII; B, BamHI; t, terminador; adh, álcool desidrogenase II de *Z.*

mobilis; *pdc*, piruvato descarboxilase de *Z. mobilis*; *cat*, cloranfenicol aciltransferase; *Ap*, .*beta*.-lactamase; *Zm Pro frags*, fragmentos de *Z. mobilis* que exibem atividade promotora; *ColE1*, origem de replicação derivada de pBR322; *oriV*, origem de replicação derivada de RSF1010; *Plac*, promotor *lac*; *PZm*, promotor de *Z. mobilis*; *P?*, promotor críptico no vetor; *Kb*, quilobases.

125 FIG. 3 mostra o crescimento e a produção de ácido pela cepa TC4 e recombinantes contendo plasmídeos que codificam enzimas etanológicas.

132 A FIG. 4 mostra a relação entre a atividade da piruvato descarboxilase em recombinantes e a extensão do crescimento. A massa celular após 24 horas de crescimento é expressa como densidade óptica a 550 nm (O.D. 550).

135 DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

136 Certas bactérias e outros organismos simples são capazes de metabolizar ativamente uma grande variedade de substratos, incluindo hexoses, pentoses e lactose. Esta é uma das razões pelas quais a *E. coli* é um hospedeiro atraente para procedimentos de DNA recombinante. A invenção aqui descrita permite a utilização de linhagens recombinantes de organismos simples para a produção de etanol a partir de fontes subutilizadas de biomassa, como a hemicelulose (xilose, arabinose, etc.), que representa grande parte da madeira e partes não comestíveis das plantas, e o soro de leite (lactose), além de outras fontes de biomassa. Além disso, organismos com capacidades especiais, como enzimas extracelulares para a degradação de polímeros complexos, podem ser convertidos em produtores de etanol usando a invenção em questão.

146 A nova invenção descrita aqui pode ser usada em conexão com muitos hospedeiros diferentes. Por exemplo, além da *E. coli*, bactérias entéricas como *Erwinia chrysanthemi* e *Klebsiella planticola* são hospedeiras particularmente atraentes porque são capazes de utilizar uma grande variedade de açúcares, incluindo pentoses e lactose. Outros hospedeiros potenciais incluem outras bactérias, leveduras, fungos e células eucarióticas. Sistemas de expressão apropriados seriam usados para o hospedeiro específico envolvido. Determinar o sistema de expressão adequado está dentro da habilidade de cientistas treinados nesta área.

153 Aqui é descrito um novo operon que direciona as células a produzir etanol. Este operon foi designado como operon de estimulação. O operon *pet* compreende genes *Z. mobilis* que codificam as atividades da álcool desidrogenase II e da piruvato descarboxilase, juntamente com sequências regulatórias apropriadas. As sequências regulatórias podem consistir em promotores, indutores, operadores, sítios de ligação ribossômica, terminadores e/ou outras sequências regulatórias. A produção de etanol em sistemas recombinantes anteriores dependia de atividades nativas nos organismos hospedeiros. Vantajosamente, a dependência da atividade da álcool desidrogenase do hospedeiro foi eliminada pela combinação de genes *Z. mobilis* que codificam a álcool desidrogenase II e a piruvato descarboxilase para formar o operon PET.

163 Usando os materiais e métodos aqui descritos, quantidades significativas de etanol podem ser produzidas em recombinantes contendo o operon *pet* em condições aeróbicas e anaeróbicas.

165 A partir da discussão anterior, deve ser prontamente aparente para um especialista na arte que o conceito divulgado aqui, ou seja, combinar genes que codificam uma via metabólica em

um único operon, é uma abordagem extremamente nova e útil. A aplicação deste conceito a uma variedade de situações em que genes de diferentes loci genéticos são combinados para criar um operon útil é prevista como parte desta invenção. A criação do operon de estimulação é apenas um exemplo desse novo conceito inventivo. Assim, usando os princípios descritos aqui, genes que codificam a atividade da álcool desidrogenase de uma variedade de organismos poderiam ser combinados com outros genes que codificam a atividade da piruvato descarboxilase para criar um operon que codifica a via desejada. Operons que codificam outras vias também poderiam ser criados. Também deve ser evidente para um especialista na arte que, para a via etanólica descrita aqui, não é necessário que os genes que codificam as atividades da álcool desidrogenase e da piruvato descarboxilase estejam sob controle comum; eles podem estar sob controle separado e até mesmo em plasmídeos diferentes, ou colocados no cromossomo.

- 169 Em condições aeróbicas em *E. coli*, o piruvato da glicólise é metabolizado principalmente pelo complexo piruvato desidrogenase e pela lactato desidrogenase (Gottschalk, G. [1986] *Bacterial Metabolism*, pp. 210-280. Springer-Verlag, Nova York), com o excesso de acetil coenzima A sendo convertido em acetato. Os K_m s aparentes para essas duas enzimas são 0,4 e 7,2 mM, respectivamente. O K_m aparente para a piruvato descarboxilase de *Z. mobilis* é igual (piruvato desidrogenase) ou menor que (lactato desidrogenase) para as duas enzimas de *E. coli*, facilitando assim a produção de acetaldeído. A regeneração de $NADH^+$ sob condições aeróbicas resulta principalmente da biossíntese e da $NADH$ oxidase (acoplada ao sistema de transporte de elétrons) com um K_m aparente de 50 μM . O K_m aparente para a álcool desidrogenase II de *Z. mobilis* é mais de quatro vezes menor do que o da NAD^+ oxidase de *E. coli*, permitindo que a enzima *Z. mobilis* compita efetivamente por pools endógenos de $NADH$ para a redução de acetaldeído a etanol.
- 193 Assim, as propriedades das enzimas etanologênicas de *Z. mobilis* e seus níveis relativamente altos de expressão são adequados para o desvio do fluxo de carbono para o etanol em condições aeróbicas.
- 196 Em condições anaeróbicas em *E. coli*, o piruvato da glicólise é metabolizado principalmente pela lactato desidrogenase e pela piruvato formato liase. Os K_m s aparentes para essas duas enzimas são 18 vezes e 5 vezes maiores, respectivamente, do que os da piruvato descarboxilase de *Z. mobilis*. Similarmente, os K_m s aparentes para as principais enzimas envolvidas na regeneração de NAD^+ em *E. coli* também são consideravelmente maiores do que aqueles para a álcool desidrogenase II de *Z. mobilis*. Assim, as enzimas etanologênicas de *Z. mobilis* são bastante competitivas por carbono (piruvato) e potencial redutor ($NADH$) com as enzimas fermentativas normais de *E. coli*, permitindo a canalização eficiente de produtos glicolíticos para o etanol.
- 205 Os genes que codificam as duas enzimas etanologênicas, denominados operon *pet*, foram expressos em altos níveis e dominaram o fluxo de carbono da oxidação de piruvato e $NADH$ durante o crescimento anaeróbico. Nessas condições, o fluxo de esqueletos de carbono do piruvato foi desviado da produção de ácidos orgânicos para a produção de etanol como principal produto de fermentação em *E. coli*.
- 210 O acúmulo de ácidos orgânicos do metabolismo do açúcar é geralmente considerado uma

consequência da fermentação durante o crescimento anaeróbico. Entretanto, quantidades apreciáveis de acetato são produzidas pela cepa parental de *E. coli* TC4, mesmo durante agitação rápida em condições aeróbicas. A produção de acetato pela cepa TC4 é progressiva desde os estágios iniciais de crescimento e não se limita aos estágios posteriores, quando a densidade celular é alta. Essa produção de ácido a partir da glicose, mesmo em condições aeróbicas, serve para limitar o crescimento em caldo e em meio sólido, conforme demonstrado pelo aumento da densidade celular final em meio suplementado com tampão fosfato.

²¹² A conversão de um organismo hospedeiro para fermentação etanólica pode ser usada para aumentar a produção de uma variedade de produtos recombinantes usando o sistema de expressão do hospedeiro. A manutenção da função desses produtos está relacionada ao pH do caldo durante o crescimento em cultura densa. A extensão dessa acidificação por unidade de proteína celular é minimizada pela produção de etanol em vez de ácidos orgânicos. A transferência de oxigênio é frequentemente uma limitação importante durante o crescimento de culturas densas de microrganismos, e é essa limitação que resulta na produção de ácido e no desvio do pH do meio de crescimento. Em recombinantes que expressam o operon *pet*, as enzimas etanologênicas de *Z. mobilis* desviam parte do piruvato da glicólise para acetaldeído e reoxidam NADH para produzir etanol, um produto menos prejudicial do metabolismo. Cepas contendo cadeias respiratórias funcionais para fosforilação oxidativa e enzimas de produção de etanol podem ser cultivadas em densidades celulares ainda maiores devido à operação de ambos os sistemas durante a regeneração de NAD⁺ e à redução de produtos residuais ácidos.

²³⁴ Essa flexibilidade inerente resulta em requisitos de controle de processo menos rigorosos, bem como em maiores rendimentos de produtos recombinantes.

²³⁶ Especificamente, a invenção em questão diz respeito ainda à descoberta de que a lactose e todos os principais açúcares (glicose, xilose, arabinose, galactose e manose) presentes na celulose e na hemicelulose podem ser convertidos em etanol por *Escherichia coli* recombinante contendo genes transmitidos por plasmídeo que codificam as enzimas para a via do etanol de *Zymomonas mobilis*. Tolerâncias ambientais, estabilidade do plasmídeo, expressão da piruvato descarboxilase de *Z. mobilis*, intervalo de substrato e produção de etanol (glicose, lactose e xilose) foram comparadas entre 8 cepas de *E. coli*. Dessas 8 cepas, *E. coli* ATCC 9637 (pLOI297), ATCC 11303 (pLOI297) e ATCC 15244 (pLOI297) foram selecionadas para desenvolvimento posterior com base na resistência ambiental e na produção de etanol. As produtividades volumétricas de etanol por hora em cultura em lote foram de aproximadamente 1,4 g de etanol/litro para glicose (12%), 1,3 g/litro para lactose (12%) e 0,64 g/litro para xilose (8%). As produtividades de etanol por hora variaram de 2,1 g de etanol/g de peso seco de células com 12% de glicose a 1,3 g de etanol/g de peso seco de células com 8% de xilose.

²⁵⁰ O rendimento de etanol por grama de xilose foi maior para *E. coli* recombinante do que comumente relatado para *Saccharomyces cerevisiae* com glicose. Glicose (12%), lactose (12%) e xilose (8%) foram convertidas em 7,2% de etanol (por vol.), 6,5% de etanol e 5,2% de etanol, respectivamente.

- 254 Uma variedade de fatores precisa ser considerada na seleção de cepas de *E. coli* adequadas para a produção de etanol, incluindo a variedade de substratos e a resistência ambiental (tolerância ao açúcar, tolerância ao sal, tolerância ao etanol, tolerância ao pH baixo e tolerância térmica). Conforme descrito aqui, a cepa ATCC 9637 (cepa Waksman W) apresenta características superiores em termos de resistência ambiental, embora a produção de etanol a partir da glicose tenha sido menor do que com outras cepas. A cepa ATCC 9637 foi selecionada principalmente por sua capacidade única de utilizar sacarose. Vantajosamente, essa característica do ATCC 9637 torna essa cepa útil na fermentação de açúcar de beterraba, açúcar de cana e outras matérias-primas com sacarose. ATCC 11303 (cepa Luria B) e ATCC 15244 (cepa Kepes ML300) contendo pLOI297 produziram os maiores níveis de etanol e exibiram níveis aceitáveis de resistência ambiental. Os plasmídeos eram bastante estáveis nessas duas construções e foram selecionados como os melhores candidatos para o desenvolvimento posterior da produção de etanol.
- 254 Ambas as construções expressaram altos níveis de piruvato descarboxilase de *Z. mobilis*, que são necessários para a produção eficiente de etanol (Ingram et al. [1987] Aplicação Meio ambiente. Microbiol. 53, supra).
- 270 Todos os principais componentes de açúcar da biomassa vegetal foram convertidos em etanol por *E. coli* recombinante contendo a via do etanol de *Z. mobilis*. A eficiência de conversão de glicose e xilose em etanol excedeu a que foi relatada anteriormente para *S. cerevisiae* (Lovitt, R. W., B. H. Kin, G.-J. Shen e J. G. Zeikus [1988] CRC Crit. Rev. Biotechnol. 7:107-186) e sistemas de leveduras fermentadoras de pentoses (Beck, M. J. [1989] Biotechnol. Bioengenharia. Simpático. 17:617-627; Jeffries, T. W. e H. K. Sreenath [1988] Biotecnologia. Bioengenharia. 31:502-506; Português Skoog, K., e B. Hahn-Hagerdal [1988] Enzima Microbiol. Tecnologia. 10:66-79; Slininger, PJ, RJ Bothast, MR Okos e MR Ladisch [1985] Biotechnol. Letão. 7:431-436). A xilose foi convertida em etanol por *E. coli* recombinante com maior eficiência do que a glicose por *S. cerevisiae* (Lovitt et al., supra). Os rendimentos anormalmente altos de etanol com xilose (mais de 100% do teórico) podem incluir etanol derivado do catabolismo de nutrientes complexos. Muitos aminoácidos e componentes complexos do meio são catabolizados em intermediários glicolíticos que são convertidos em piruvato.
- 284 Esse piruvato poderia então ser convertido em etanol.
- 285 Este trabalho demonstra que recombinantes podem ser desenvolvidos para produção comercial de etanol e ilustra a viabilidade de mudanças drásticas no fluxo metabólico para o desenvolvimento futuro de novos produtos a partir de microrganismos. Além disso, as cepas que contêm o operon *pet* crescem até densidades celulares mais altas do que os organismos parentais em condições anaeróbicas com glicose e oferecem o potencial para o aumento da produção de produtos recombinantes em microrganismos, ao mesmo tempo em que reduzem as complicações associadas à produção de ácido.
- 292 MATERIAIS E MÉTODOS
- 293 Organismos e condições de crescimento. *E. coli* TC4 (Conway, T., Y. A. Osman, J. I. Konnan, E. M. Hoffmann e L. O. Ingram [1987] "Promotor e sequências de nucleotídeos da descarboxilase de piruvato de *Zymomonas mobilis*", J. Bacteriol. 169:949-954) e derivados

contendo plasmídeos foram usados no presente estudo. Plasmídeos contendo o gene da piruvato descarboxilase (pLOI276) e o gene da álcool desidrogenase B (pLOI284) foram descritos anteriormente (Conway e Osman et al. [1987], "Promotor e sequências de nucleotídeos . . .", supra; Conway, T., G. W. Sewell, Y. A. Osman e L. O. Ingram [1987] "Clonagem e sequenciamento do gene da álcool desidrogenase II de *Zymomonas mobilis*," J. Bacteriol. 169:2591-2597).

299 Cepas e condições de crescimento. Plasmídeos pUC18 e pUC19 (Yanisch-Perron, C., J. Vieira e J. Messing [1985] "Vetores de clonagem de fase M13 melhorados e linhagens hospedeiras: sequência de nucleotídeos dos vetores M13mp18 e pUC19", Gene 33:103-119), pLOI204 (Conway, T., M. O.-K. Byung e L. O. Ingram [1987] "Vetor de expressão para *Zymomonas mobilis*", Appl. Meio ambiente. Microbiol. 53:235-241) e pLOI295 (Ingram et al. [1987], supra) foram descritos anteriormente. A construção e as propriedades de pLOI292, pLOI291, pLOI297, pLOI308, pLOI308-2, pLOI308-5 e pLOI308-10 são descritas abaixo.

312 As culturas foram cultivadas a 37 °C em caldo Luria (Luria, S. E. e M. Delbruck [1943] "Mutações de bactérias da sensibilidade do vírus à resistência do vírus", Genetics 28:491-511) contendo 50 g de glicose por litro. Células para análises enzimáticas e inóculos para estudos de fermentação foram cultivados em tubos (13 por 100 mm) contendo 3 ml de caldo a 37 °C em um rotador de tubos. As culturas noturnas foram diluídas 100 vezes em meio fresco. Culturas aeróbicas (50 ml de caldo em frascos de 250 ml) foram agitadas em banho-maria recíprocante (120 oscilações por minuto). As culturas anaeróbicas foram cultivadas em frascos de soro rolhados (100 ml de caldo em frascos de 130 ml) com agitação giratória (150 rpm) em uma incubadora a 37 °C. As culturas anaeróbicas foram ventiladas com uma agulha de calibre 25 para permitir a saída dos produtos gasosos da fermentação.

322 O crescimento foi monitorado espectrofotometricamente com um espectrofotômetro Spectronic 70 (Bausch & Lomb, Inc., Rochester, N.Y.) a 550 nm. Tubos de cultura descartáveis (10 por 75 mm) foram usados como cubetas. Uma unidade de absorvância em nossas condições continha aproximadamente 0,25 mg de proteína celular por ml. O crescimento foi medido em A550; 1,0 unidade de absorvância é equivalente a 0,25 mg de proteína celular total por ml.

327 Os hospedeiros de *E. coli* contendo os plasmídeos da invenção em questão foram depositados na American Type Culture Collection (ATCC), 12301 Parklawn Drive, Rockville, Md. 20852 EUA. Os números de acesso e as datas de depósito são os seguintes:

	Número de acesso da cultura	Data do depósito
	E. coli pLOI308-10 ATCC 67983	15 de maio de 1989
TC4(pLOI292)	ATCC 68237	23 de fevereiro de 1990
TC4(pLOI308-11)	ATCC 68238	23 de fevereiro de 1990
TC4(pLOI297)	ATCC 68239	23 de fevereiro de 1990
TC4(pLOI295)	ATCC 68240	23 de fevereiro de 1990

336 As culturas em questão foram depositadas sob condições que asseguram que o acesso às culturas estará disponível durante a pendência deste pedido de patente para alguém determinado pelo Comissário de Patentes e Marcas Registradas como tendo direito a elas de acordo com 37 CFR 1.14 e 35 USC 122. Os depósitos estão disponíveis conforme exigido pelas leis de patentes estrangeiras em países onde as contrapartes do pedido em questão, ou

sua progênie, são arquivadas. Entretanto, deve ser entendido que a disponibilidade dos depósitos não constitui uma licença para praticar a invenção em questão em derrogação dos direitos de patente concedidos por ação governamental.

346 Além disso, os depósitos de cultura em questão serão armazenados e disponibilizados ao público de acordo com as disposições do Tratado de Budapeste para o Depósito de Microrganismos, ou seja, serão armazenados com todo o cuidado necessário para mantê-los viáveis e não contaminados por um período de pelo menos cinco anos após a solicitação mais recente para o fornecimento de uma amostra dos depósitos e, em qualquer caso, por um período de pelo menos 30 (trinta) anos após a data do depósito ou pela vida útil de qualquer patente que possa ser emitida divulgando as culturas. O depositante reconhece o dever de repor os depósitos caso o depositário não consiga fornecer uma amostra quando solicitada, devido às condições dos depósitos. Todas as restrições à disponibilidade ao público dos depósitos de cultura em questão serão irrevogavelmente removidas mediante a concessão de uma patente que os divulgue.

360 Técnicas genéticas. Transformações, construções de plasmídeos, digestões de DNA e análises foram realizadas conforme descrito anteriormente. Os recombinantes foram selecionados em meio sólido (1,5% ágar) contendo 2 g de glicose por litro e antibióticos apropriados. Recombinantes contendo genes etanologênicos funcionais de *Z. mobilis* foram identificados por seu crescimento como colônias superdimensionadas em placas de ágar Luria contendo glicose e foram confirmados por seu baixo crescimento em placas de ágar Luria sem glicose e pela expressão de álcool desidrogenase em meio indicador de aldeído.

367 Ensaio enzimático. As células foram rompidas, inativadas pelo calor e analisadas quanto à atividade da piruvato descarboxilase (termoestáveis), conforme descrito anteriormente (Conway e Osman et al. [1987] "Sequências promotoras e nucleotídicas...", supra). As células foram preparadas e analisadas quanto à atividade da álcool desidrogenase II na direção da oxidação do etanol, conforme descrito anteriormente, exceto que as células foram lavadas e rompidas em tampão de fosfato de potássio 30 mM ao qual sulfato de amônio ferroso sólido (concentração final, 0,5 mM) e ascorbato de sódio (10 mM) foram adicionados recentemente, conforme descrito por Neale et al. (Neale, A. D., R. K. Scopes, J. M. Kelly e R. E. H. Wettenhall [1986] "As duas álcool desidrogenases de *Zymomonas mobilis*: purificação por cromatografia diferencial de ligante de corante, caracterização molecular e papel fisiológico", Eur. J. Bioquímica. 154:119-124). Essa modificação, juntamente com a análise imediata da atividade da álcool desidrogenase sem armazenamento, resultou em uma atividade específica muito maior do que a relatada anteriormente.

380 A proteína foi medida com o reagente de fenol Folin (Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr e R. J. Randall [1951] "Medição de proteína com o reagente de fenol Folin", J. Biol. Química. 193:265-275).

383 Análise de produtos de fermentação. Os produtos de fermentação foram determinados em caldo clarificado com um cromatógrafo líquido de alta eficiência Millipore/Waters (Millipore Corp., Bedford, Mass.) equipado com um monitor de índice de refração e um integrador eletrônico. As separações foram realizadas em uma coluna Aminex HPX-87H (300 por 7,8 mm) adquirida da Bio-Rad Laboratories, Richmond, Califórnia, a 65 °C e com vazão de 0,25

ml/min (volume de injeção de 100 µl). Os picos foram identificados usando padrões autênticos. Os dois picos eluídos antes da glicose e o pico posterior desconhecido eluído em 45,4 a 45,8 min são componentes do meio não inoculado.

393 A seguir estão exemplos que ilustram procedimentos, incluindo o melhor modo, para praticar a invenção. Esses exemplos não devem ser interpretados como limitantes. Todas as porcentagens são em peso e todas as proporções da mistura de solventes são em volume, salvo indicação em contrário.

400 EXEMPLO 1

401 Construção de tensão

402 Os tamanhos dos genes estruturais que codificam a piruvato descarboxilase e a álcool desidrogenase II são 1,7 e 1,1 quilobases, respectivamente, e esses genes codificam proteínas com pesos moleculares de 60.000 e 40.100. Cada um desses genes está localizado em derivados de pUC18 sob o controle do promotor lac (FIG. 1). Os dois genes são combinados pela inserção do fragmento de 1,4 quilobase sem promotor gerado pelas endonucleases de restrição EcoRI e Sall de pLOI284 (álcool desidrogenase) no sítio BamHI a jusante do gene da piruvato descarboxilase em pLOI276. Esses clones foram selecionados pela resistência à ampicilina e pela presença e expressão da atividade da álcool desidrogenase em uma placa indicadora de pararosanilina-etanol recentemente desenvolvida, que detecta a produção de aldeídos. Os clones contendo a construção indicada, pLOI295, cresceram mal na superfície de placas de ágar Luria (aeróbico) na ausência de glicose adicionada, mas cresceram em densidades muito maiores do que a cepa sem plasmídeo e as cepas contendo pLOI276 ou pLOI284 em placas de ágar contendo 2% de glicose.

415 Recombinantes contendo o operon pet foram prontamente detectados como colônias maiores e mais opacas em placas de ágar Luria (aeróbicas) contendo glicose. Essa diferença no tamanho e na opacidade da colônia provou ser um marcador útil para a identificação de recombinantes que contêm plasmídeos que expressam genes de álcool desidrogenase e piruvato descarboxilato.

420 A sequência de bases completa do pLOI295 é conhecida. O quadro de leitura aberto para o gene que codifica a piruvato descarboxilase começa 163 bases a jusante do promotor lac e termina com dois códons de parada 85 bases a montante do quadro de leitura aberto do gene que codifica a álcool desidrogenase II. Ambos os genes incluem sequências que se assemelham a sítios de ligação ao ribossomo imediatamente a montante de cada quadro de leitura aberto. O gene que codifica a álcool desidrogenase II contém um único códon de parada seguido por uma sequência palíndrômica de 13 pares de bases que serve como um terminador transcricional.

428 EXEMPLO 2

429 Expressão de genes de *Z. mobilis* em *E. coli*

430 Os genes da piruvato descarboxilase e da álcool desidrogenase II foram expressos em altos níveis em *E. coli* sob o controle do promotor lac individualmente (pLOI276 e pLOI284, respectivamente) e em conjunto. A piruvato descarboxilase não está presente na *E. coli* selvagem, mas uma álcool desidrogenase induzível está presente em baixas concentrações. Durante o crescimento de *E. coli* na presença de glicose, as atividades específicas das

enzimas de *Z. mobilis* diminuíram em aproximadamente 50%, o que é consistente com a repressão da glicose no promotor *lac*. A atividade específica da piruvato descarboxilase, codificada pelo gene proximal no operon *pet*, foi três vezes maior em pLOI295 do que em pLOI276. A atividade específica do produto do gene da álcool desidrogenase II, o gene distal no operon *pet*, foi expressa em pLOI295 em um nível duas vezes maior que o de pLOI284.

440 EXEMPLO 3

446 Fermentação de glicose por cepas recombinantes

447 A expressão do operon *pet* em *E. coli* resultou na produção de etanol como o principal produto de fermentação durante o crescimento anaeróbico. A cepa parental produziu succinato (1,5 mM), lactato (18 mM) e acetato (7 mM) como principais produtos de fermentação (FIG. 3A). Um perfil de fermentação idêntico foi observado em células contendo pLOI284, que carrega o gene da álcool desidrogenase II (FIG. 3C). Com pLOI276 carregando o gene que codifica a piruvato descarboxilase, um pico de etanol é claramente evidente (18 mM), equivalente a um terço dos produtos de fermentação acumulados. Esse nível mais alto de etanol resulta das atividades combinadas da piruvato descarboxilase de *Z. mobilis* e da álcool desidrogenase nativa de *E. coli*. Com pLOI295 contendo o operon *pet* (genes da piruvato descarboxilase e da álcool desidrogenase II de *Z. mobilis*), *E. coli* produziu grandes quantidades de etanol (750 mM; 4,3%, vol/vol), o que representou mais de 95% dos produtos de fermentação.

458 Os altos níveis de álcool desidrogenase e piruvato descarboxilase produzidos em células contendo o operon *pet* dominaram a oxidação de NADH em *E. coli*. Assim, a fermentação deste organismo foi convertida no equivalente àquelas de *S. cerevisiae* e *Z. mobilis*. Durante o crescimento fermentativo normal, o piruvato é convertido em acetil coenzima A pelo complexo piruvato desidrogenase, em oxaloacetato (e depois em succinato) pela fosfoenolpiruvato carboxilase, em formato e acetil coenzima pela piruvato formato liase e em lactato pela lactato desidrogenase. Esta última via é a rota dominante para a regeneração de NAD⁺ em cepas não modificadas de *E. coli*. No entanto, os *K_m*s para lactato desidrogenases bacterianas são bastante altos, variando de 10 a 1.000 mM (Garvie, E. I. [1980] "Bacterial lactate dehydrogenases," Microbiol. Rev. 44:106-139; Tarmy, E. M., e N. O. Kaplan [1968] "Cinética da *Escherichia coli* B D-lactato desidrogenase e evidências de mudança controlada por piruvato na conformação", J. Biol.

470 Química. 243:2587-2596). O *K_m* da piruvato descarboxilase de *Z. mobilis* é 0,4 mM (Bringer-Meyer, S., K.-L. Schimz e H. Sahm [1986] "Piruvato descarboxilase de *Zymomonas mobilis*: isolamento e caracterização parcial", Arch. Microbiologia. 146:105-110). A abundância dessa enzima, juntamente com o menor *K_m*, desvia efetivamente o fluxo de piruvato da glicólise para o etanol.

475 Altas densidades celulares também são alcançadas durante condições de crescimento misto com agitação moderada ou agitação de recipientes de cultura nos quais a troca gasosa não é restrita. Nessas condições, foi observado um pH final de 6,3 ou superior, dependendo da extensão da aeração.

479 EXEMPLO 4

480 Construções de plasmídeos e expressão de enzimas etanologênicas de *Z. mobilis* em *E. coli*

481 O plasmídeo pLOI295 contém os genes *Z. mobilis* que codificam a piruvato descarboxilase e a

assumindo uma atividade específica de 100 para a enzima pura @c Calculado assumindo uma atividade específica de 710 para a enzima pura após a subtração da atividade da álcool desidrogenase nativa.

538 As atividades da álcool desidrogenase nas cepas recombinantes seguiram a mesma tendência em termos de expressão de diferentes plasmídeos que a piruvato descarboxilase. As atividades da álcool desidrogenase medidas representam uma combinação da enzima nativa de *E. coli* e da enzima *Z. mobilis*. O nível observado na cepa TC4 sem plasmídeo foi relativamente pequeno em comparação aos observados em cepas portadoras de plasmídeos com o gene *Z. mobilis*. As atividades da enzima *Z. mobilis* (corrigida para a álcool desidrogenase nativa de *E. coli*) variaram de 0,13 UI/mg de proteína celular da cepa TC4 (pLOI291) a 9,6 UI em TC4 (pLOI295).

549 EXEMPLO 5

550 Crescimento de cepas recombinantes contendo enzimas etanologênicas de *Z. mobilis*

551 A mudança do catabolismo da glicose para a produção de etanol também afetou o rendimento do crescimento e o desvio do pH do meio de crescimento. Embora os produtos de fermentação sejam relativamente atóxicos, eles podem acumular níveis tóxicos durante a fermentação. Durante o crescimento anaeróbico em frascos contendo caldo Luria contendo 10% de glicose, a cepa livre de plasmídeo e a cepa portadora de pLOI284 (portadora do gene que codifica a álcool desidrogenase II) atingiram uma densidade final de 0,25 mg de proteína celular por ml após 48 horas, com um pH final de 4,4. A densidade celular aumentou duas vezes na cepa portadora de pLOI276 (portadora do gene que codifica a piruvato descarboxilase), com um pH final de 4,5. A densidade celular final da cepa portadora de pLOI295 (operon pet) foi de 2,5 mg/ml, 10 vezes maior que a da cepa controle. O pH final foi 4,7. Em uma densidade de 2,5 mg de proteína celular por ml, o magnésio parece ser limitante, e um aumento de 1,5 vez na densidade celular é facilmente obtido pela adição de 0,5 mM de sulfato de magnésio.

564 O crescimento das cepas recombinantes foi examinado em condições aeróbicas e anaeróbicas (FIG. 3). Em condições aeróbicas (FIG. 3A e Tabela 2), a cepa TC4 cresceu com um tempo de geração de aproximadamente 30 min durante a fase mais rápida de crescimento. A cepa TC4 portadora dos derivados de pLOI308 apresentou taxas máximas de crescimento equivalentes, com tempos de geração entre 26 e 30 min. A cepa TC4(pLOI295) cresceu mal nessas condições (tempo de geração, 71 min) e foi acompanhada por lise parcial. As cepas TC4(pLOI291) e TC4(pLOI292) cresceram em taxas intermediárias, cada uma com um tempo de geração de 46 min. TABELA 2

Tempos máximos de geração, densidades celulares finais e pHs finais do caldo durante o crescimento aeróbico e anaeróbico. Densidade celular

	Crescimento (mg de Geração	Condição	Proteína plasmídica/ml)	Tempo (min)	pH final	
		Aeróbico	Nenhum	0,7 29 4,4		
pLOI291	0,7 46 5,3	pLOI292	1,3 46 5,1	pLOI295	1,1 71 5,7	
pLOI308-2	1,7 27 5,5	pLOI308-5	0,8 30 5,0	pLOI308-10	2,5 26 5,0	
Anaeróbico	Nenhum	0,3 32 4,4	pLOI291	0,4 40 4,5	pLOI292	1,0 48 5,0
pLOI295	2,1 39 4,7	pLOI308-2	0,8 42 5,7	pLOI308-5	0,4 38 4,9	
pLOI308-10	2,2 41 5,2					

@a Medido após 24 horas de

crescimento.

- 596 Em condições anaeróbicas (FIG. 3B e Tabela 2), o tempo de geração para a cepa TC4 sem plasmídeo foi de 32 min, consideravelmente menor do que para as cepas recombinantes contendo as enzimas etanologênicas. Todos os recombinantes exibiram taxas máximas de crescimento semelhantes, com tempos de geração entre 38 e 41 min, exceto TC4(pLOI292), que cresceu um pouco mais lentamente, com um tempo de geração de 48 min.
- 602 Todos os recombinantes, exceto TC4(pLOI295), cresceram após 12 horas sob condições de crescimento anaeróbico e aeróbico até densidades celulares equivalentes ou maiores do que aquelas da cepa TC4 sem um plasmídeo (FIGS. 3A e B). A Tabela 2 resume as densidades celulares finais da cepa TC4 e dos recombinantes após 24 horas de crescimento. Em condições aeróbicas, a cepa TC4 contendo pLOI308-10 atingiu a maior densidade celular, seguida pela TC4 contendo pLOI308-2, pLOI292, pLOI295 (com alguma lise aparente) e pLOI308-5.
- 609 Em condições anaeróbicas, as densidades celulares finais da cepa TC4 contendo pLOI308-10 e pLOI295 foram aproximadamente equivalentes, seguidas pelas de TC4 contendo pLOI292, pLOI308-2, pLOI308-5 e pLOI291.
- 612 A FIG. 4 mostra a relação entre o nível de atividade da piruvato descarboxilase nas células e a densidade celular final após 24 horas de crescimento. Como a síntese da piruvato descarboxilase é acoplada à da álcool desidrogenase II nesses recombinantes, este gráfico representa os efeitos do sistema alternativo *Z. mobilis* para regeneração de NAD⁺ na densidade celular final. A partir desses dados, fica claro que a expressão da via *Z. mobilis* para a produção de etanol aumenta a densidade celular final em condições anaeróbicas e aeróbicas. Na cepa TC4 (pLOI308-10), os níveis de expressão de piruvato descarboxilase (6,5 UI) e álcool desidrogenase II (2,5 UI) foram quase ótimos para o crescimento anaeróbico e aeróbico. O nível de expressão de enzimas etanologênicas na cepa TC4(pLOI295) parece ser excessivo, resultando em diminuição do crescimento celular acompanhado de lise parcial em condições aeróbicas e crescimento ligeiramente reduzido em condições anaeróbicas.
- 623 O aumento do crescimento da cepa TC4(pLOI295) sob condições anaeróbicas com pouca lise aparente, em contraste com o baixo crescimento e lise durante o crescimento em frascos agitados rapidamente, sugeriu que um ambiente altamente aeróbico pode ser prejudicial a esta construção. A lise neste recombinante foi drasticamente reduzida e a densidade celular final aumentou durante o crescimento em frascos agitados quando a velocidade de oscilação foi reduzida em um terço.
- 629 EXEMPLO 6
- 630 Efeitos das enzimas etanologênicas na acidificação do caldo durante o crescimento
- 631 FIG. 3C mostra um gráfico das mudanças no pH do caldo durante o crescimento anaeróbico. O pH caiu rapidamente durante as primeiras 6 horas de crescimento da cepa TC4 sem plasmídeo, mas declinou mais lentamente em derivados contendo enzimas etanologênicas. A acidificação durante as 12 horas iniciais foi reduzida em maior extensão na cepa TC4 contendo pLOI295, seguida pela TC4 contendo pLOI308-10, pLOI308-2 e pLOI308-5. Os dados para as cepas TC4(pLOI291) e TC4(pLOI292) não são mostrados, mas estão abaixo e acima daqueles para TC4(pLOI308-5), respectivamente. Embora os recombinantes tenham

atingido uma densidade celular final mais alta, o pH do caldo dos recombinantes cultivados em condições anaeróbicas e aeróbicas por 24 horas foi menos ácido do que o do caldo da cepa TC4 sem enzimas etanologênicas (Tabela 2).

645 A taxa e extensão reduzidas da acidificação em recombinantes, acompanhadas pelo aumento do crescimento celular, sugeriram que a queda no pH foi um fator importante que limitou o crescimento, mesmo em condições altamente aeróbicas. Esta hipótese foi apoiada por um aumento de 85% na densidade celular final da cepa TC4 (sem plasmídeo) cultivada em meio suplementado com um volume de 1/10 de tampão fosfato de sódio 1M (pH 7,0). Níveis mais baixos de adição de tampão resultaram em níveis intermediários de crescimento.

654 EXEMPLO 7

655 Efeitos de enzimas etanologênicas em produtos de fermentação

656 A Tabela 3 resume as análises dos produtos de fermentação feitos pela cepa TC4 e os recombinantes após 24 horas de crescimento em condições aeróbicas e anaeróbicas. Em condições aeróbicas, o acetato foi o principal produto de fermentação acumulado durante o crescimento da cepa TC4 sem plasmídeo em meio rico, sem etanol detectável. A quantidade de acetato produzida foi drasticamente reduzida em cepas contendo enzimas etanologênicas de *Z. mobilis*, e o etanol apareceu como o principal produto de fermentação. A cepa TC4 contendo pLOI308-10 produziu mais etanol, seguida pela TC4 contendo pLOI295, pLOI308-2, pLOI292, pLOI308-5 e pLOI291. Sob essas condições aeróbicas, pequenas quantidades de lactato também foram produzidas (0,6 a 1,2 mM) por todas essas cepas. Apenas a cepa TC4 contendo pLOI308-10 acumulou quantidades apreciáveis de succinato, embora este produto ainda representasse apenas 1% do total de produtos de fermentação, com 94% sendo etanol.

TABELA 3 _____ Comparação dos produtos de

fermentação durante o crescimento aeróbico e anaeróbico Crescimento Produto de fermentação [mM (DP)] Condição Plasmídeo Succinato Lactato Acetato Etanol

	Aeróbico	Nenhum	0,2 (0,1)	0,6 (0,2)	55 (2)	Tr
pLOI308-2 Tr	1,2 (0,3)	22 (2)	98 (3)	pLOI308-5 Tr	0,9 (0,2)	43 (3)
1,0 (0,2)	17 (2)	337 (21)	pLOI295 Tr	1,1 (0,4)	13 (1)	114 (10)
pLOI292 Tr	1,3 (0,2)	30 (1,5)	24 (1)	Anaero- Nenhum	0,9 (0,1)	22 (1)
pLOI308-2	0,8 (0,1)	7 (0,5)	4 (0,3)	71 (5)	pLOI308-5	0,3 (0,1)
5,0 (0,4)	10 (1)	1,2 (0,2)	482 (23)	pLOI295	2,2 (0,20)	6 (1)
pLOI291	1,0 (0,1)	15 (0,5)	7 (0,2)	4 (0,5)	pLOI292	2,3 (0,2)
pLOI308-10	5,0 (0,4)	10 (1)	1,2 (0,2)	482 (23)	pLOI295	2,2 (0,20)
pLOI308-5	0,3 (0,1)	18 (2)	6 (1)	16 (2)	pLOI308-10	5,0 (0,4)
pLOI291	1,0 (0,1)	15 (0,5)	7 (0,2)	4 (0,5)	pLOI292	2,3 (0,2)
pLOI308-2	0,8 (0,1)	7 (0,5)	4 (0,3)	71 (5)	pLOI308-5	0,3 (0,1)
pLOI308-10	5,0 (0,4)	10 (1)	1,2 (0,2)	482 (23)	pLOI295	2,2 (0,20)
pLOI291	1,0 (0,1)	15 (0,5)	7 (0,2)	4 (0,5)	pLOI292	2,3 (0,2)
pLOI308-2	0,8 (0,1)	7 (0,5)	4 (0,3)	71 (5)	pLOI308-5	0,3 (0,1)
pLOI308-10	5,0 (0,4)	10 (1)	1,2 (0,2)	482 (23)	pLOI295	2,2 (0,20)
pLOI291	1,0 (0,1)	15 (0,5)	7 (0,2)	4 (0,5)	pLOI292	2,3 (0,2)
pLOI308-2	0,8 (0,1)	7 (0,5)	4 (0,3)	71 (5)	pLOI308-5	0,3 (0,1)
pLOI308-10	5,0 (0,4)	10 (1)	1,2 (0,2)	482 (23)	pLOI295	2,2 (0,20)
pLOI291	1,0 (0,1)	15 (0,5)	7 (0,2)	4 (0,5)	pLOI292	2,3 (0,2)
pLOI308-2	0,8 (0,1)	7 (0,5)	4 (0,3)	71 (5)	pLOI308-5	0,3 (0,1)
pLOI308-10	5,0 (0,4)	10 (1)	1,2 (0,2)	482 (23)	pLOI295	2,2 (0,20)
pLOI291	1,0 (0,1)	15 (0,5)	7 (0,2)	4 (0,5)	pLOI292	2,3 (0,2)
pLOI308-2	0,8 (0,1)	7 (0,5)	4 (0,3)	71 (5)	pLOI308-5	0,3 (0,1)
pLOI308-10	5,0 (0,4)	10 (1)	1,2 (0,2)	482 (23)	pLOI295	2,2 (0,20)
pLOI291	1,0 (0,1)	15 (0,5)	7 (0,2)	4 (0,5)	pLOI292	2,3 (0,2)
pLOI308-2	0,8 (0,1)	7 (0,5)	4 (0,3)	71 (5)	pLOI308-5	0,3 (0,1)
pLOI308-10	5,0 (0,4)	10 (1)	1,2 (0,2)	482 (23)	pLOI295	2,2 (0,20)
pLOI291	1,0 (0,1)	15 (0,5)	7 (0,2)	4 (0,5)	pLOI292	2,3 (0,2)
pLOI308-2	0,8 (0,1)	7 (0,5)	4 (0,3)	71 (5)	pLOI308-5	0,3 (0,1)
pLOI308-10	5,0 (0,4)	10 (1)	1,2 (0,2)	482 (23)	pLOI295	2,2 (0,20)
pLOI291	1,0 (0,1)	15 (0,5)	7 (0,2)	4 (0,5)	pLOI292	2,3 (0,2)
pLOI308-2	0,8 (0,1)	7 (0,5)	4 (0,3)	71 (5)	pLOI308-5	0,3 (0,1)
pLOI308-10	5,0 (0,4)	10 (1)	1,2 (0,2)	482 (23)	pLOI295	2,2 (0,20)
pLOI291	1,0 (0,1)	15 (0,5)	7 (0,2)	4 (0,5)	pLOI292	2,3 (0,2)
pLOI308-2	0,8 (0,1)	7 (0,5)	4 (0,3)	71 (5)	pLOI308-5	0,3 (0,1)
pLOI308-10	5,0 (0,4)	10 (1)	1,2 (0,2)	482 (23)	pLOI295	2,2 (0,20)
pLOI291	1,0 (0,1)	15 (0,5)	7 (0,2)	4 (0,5)	pLOI292	2,3 (0,2)
pLOI308-2	0,8 (0,1)	7 (0,5)	4 (0,3)	71 (5)	pLOI308-5	0,3 (0,1)
pLOI308-10	5,0 (0,4)	10 (1)	1,2 (0,2)	482 (23)	pLOI295	2,2 (0,20)
pLOI291	1,0 (0,1)	15 (0,5)	7 (0,2)	4 (0,5)	pLOI292	2,3 (0,2)
pLOI308-2	0,8 (0,1)	7 (0,5)	4 (0,3)	71 (5)	pLOI308-5	0,3 (0,1)
pLOI308-10	5,0 (0,4)	10 (1)	1,2 (0,2)	482 (23)	pLOI295	2,2 (0,20)
pLOI291	1,0 (0,1)	15 (0,5)	7 (0,2)	4 (0,5)	pLOI292	2,3 (0,2)
pLOI308-2	0,8 (0,1)	7 (0,5)	4 (0,3)	71 (5)	pLOI308-5	0,3 (0,1)
pLOI308-10	5,0 (0,4)	10 (1)	1,2 (0,2)	482 (23)	pLOI295	2,2 (0,20)
pLOI291	1,0 (0,1)	15 (0,5)	7 (0,2)	4 (0,5)	pLOI292	2,3 (0,2)
pLOI308-2	0,8 (0,1)	7 (0,5)	4 (0,3)	71 (5)	pLOI308-5	0,3 (0,1)
pLOI308-10	5,0 (0,4)	10 (1)	1,2 (0,2)	482 (23)	pLOI295	2,2 (0,20)
pLOI291	1,0 (0,1)	15 (0,5)	7 (0,2)	4 (0,5)	pLOI292	2,3 (0,2)
pLOI308-2	0,8 (0,1)	7 (0,5)	4 (0,3)	71 (5)	pLOI308-5	0,3 (0,1)
pLOI308-10	5,0 (0,4)	10 (1)	1,2 (0,2)	482 (23)	pLOI295	2,2 (0,20)
pLOI291	1,0 (0,1)	15 (0,5)	7 (0,2)	4 (0,5)	pLOI292	2,3 (0,2)
pLOI308-2	0,8 (0,1)	7 (0,5)	4 (0,3)	71 (5)	pLOI308-5	0,3 (0,1)
pLOI308-10	5,0 (0,4)	10 (1)	1,2 (0,2)	482 (23)	pLOI295	2,2 (0,20)
pLOI291	1,0 (0,1)	15 (0,5)	7 (0,2)	4 (0,5)	pLOI292	2,3 (0,2)
pLOI308-2	0,8 (0,1)	7 (0,5)	4 (0,3)	71 (5)	pLOI308-5	0,3 (0,1)
pLOI308-10	5,0 (0,4)	10 (1)	1,2 (0,2)	482 (23)	pLOI295	2,2 (0,20)
pLOI291	1,0 (0,1)	15 (0,5)	7 (0,2)	4 (0,5)	pLOI292	2,3 (0,2)
pLOI308-2	0,8 (0,1)	7 (0,5)	4 (0,3)	71 (5)	pLOI308-5	0,3 (0,1)
pLOI308-10	5,0 (0,4)	10 (1)	1,2 (0,2)	482 (23)	pLOI295	2,2 (0,20)
pLOI291	1,0 (0,1)	15 (0,5)	7 (0,2)	4 (0,5)	pLOI292	2,3 (0,2)
pLOI308-2	0,8 (0,1)	7 (0,5)	4 (0,3)	71 (5)	pLOI308-5	0,3 (0,1)
pLOI308-10	5,0 (0,4)	10 (1)	1,2 (0,2)	482 (23)	pLOI295	2,2 (0,20)
pLOI291	1,0 (0,1)	15 (0,5)	7 (0,2)	4 (0,5)	pLOI292	2,3 (0,2)
pLOI308-2	0,8 (0,1)	7 (0,5)	4 (0,3)	71 (5)	pLOI308-5	0,3 (0,1)
pLOI308-10	5,0 (0,4)	10 (1)	1,2 (0,2)	482 (23)	pLOI295	2,2 (0,20)
pLOI291	1,0 (0,1)	15 (0,5)	7 (0,2)	4 (0,5)	pLOI292	2,3 (0,2)
pLOI308-2	0,8 (0,1)	7 (0,5)	4 (0,3)	71 (5)	pLOI308-5	0,3 (0,1)
pLOI308-10	5,0 (0,4)	10 (1)	1,2 (0,2)	482 (23)	pLOI295	2,2 (0,20)
pLOI291	1,0 (0,1)	15 (0,5)	7 (0,2)	4 (0,5)	pLOI292	2,3 (0,2)
pLOI308-2	0,8 (0,1)	7 (0,5)	4 (0,3)	71 (5)	pLOI308-5	0,3 (0,1)
pLOI308-10	5,0 (0,4)	10 (1)	1,2 (0,2)	482 (23)	pLOI295	2,2 (0,20)
pLOI291	1,0 (0,1)	15 (0,5)	7 (0,2)	4 (0,5)	pLOI292	2,3 (0,2)
pLOI308-2	0,8 (0,1)	7 (0,5)	4 (0,3)	71 (5)	pLOI308-5	0,3 (0,1)
pLOI308-10	5,0 (0,4)	10 (1)	1,2 (0,2)	482 (23)	pLOI295	2,2 (0,20)
pLOI291	1,0 (0,1)	15 (0,5)	7 (0,2)	4 (0,5)	pLOI292	2,3 (0,2)
pLOI308-2	0,8 (0,1)	7 (0,5)	4 (0,3)	71 (5)	pLOI308-5	0,3 (0,1)
pLOI308-10	5,0 (0,4)	10 (1)	1,2 (0,2)	482 (23)	pLOI295	2,2 (0,20)
pLOI291	1,0 (0,1)	15 (0,5)	7 (0,2)	4 (0,5)	pLOI292	2,3 (0,2)
pLOI308-2	0,8 (0,1)	7 (0,5)	4 (0,3)	71 (5)	pLOI308-5	0,3 (0,1)
pLOI308-10	5,0 (0,4)	10 (1)	1,2 (0,2)	482 (23)	pLOI295	2,2 (0,20)
pLOI291	1,0 (0,1)	15 (0,5)	7 (0,2)	4 (0,5)	pLOI292	2,3 (0,2)
pLOI308-2	0,8 (0,1)	7 (0,5)	4 (0,3)	71 (5)	pLOI308-5	0,3 (0,1)
pLOI308-10	5,0 (0,4)	10 (1)	1,2 (0,2)	482 (23)	pLOI295	2,2 (0,20)
pLOI291	1,0 (0,1)	15 (0,5)	7 (0,2)	4 (0,5)	pLOI292	2,3 (0,2)
pLOI308-2	0,8 (0,1)	7 (0,5)	4 (0,3)	71 (5)	pLOI308-5	0,3 (0,1)
pLOI308-10	5,0 (0,4)	10 (1)	1,2 (0,2)	482 (23)	pLOI295	2,2 (0,20)
pLOI291	1,0 (0,1)	15 (0,5)	7 (0,2)	4 (0,5)	pLOI292	2,3 (0,2)
pLOI308-2	0,8 (0,1)	7 (0,5)	4 (0,3)	71 (5)	pLOI308-5	0,3 (0,1)
pLOI308-10	5,0 (0,4)	10 (1)	1,2 (0,2)	482 (23)	pLOI295	2,2 (0,20)
pLOI291	1,0 (0,1)	15 (0,5)	7 (0,2)	4 (0,5)	pLOI292	2,3 (0,2)
pLOI308-2	0,8 (0,1)	7 (0,5)	4 (0,3)	71 (5)	pLOI308-5	0,3 (0,1)
pLOI308-10	5,0 (0,4)	10 (1)	1,2 (0,2)	482 (23)	pLOI295	2,2 (0,20)
pLOI291	1,0 (0,1)	15 (0,5)	7 (0,2)	4 (0,5)	pLOI292	2,3 (0,2)
pLOI308-2	0,8 (0,1)	7 (0,5)	4 (0,3)	71 (5)	pLOI308-5	0,3 (0,1)
pLOI308-10	5,0 (0,4)	10 (1)	1,2 (0,2)	482 (23)	pLOI295	2,2 (0,20)
pLOI291	1,0 (0,1)	15 (0,5)	7 (0,2)	4 (0,5)	pLOI292	2,3 (0,2)
pLOI308-2	0,8 (0,1)	7 (0,5)	4 (0,3)	71 (5)	pLOI308-5	0,3 (0,1)
pLOI308-10	5,0 (0,4)	10 (1)	1,2 (0,2)	482 (23)	pLOI295	2,2 (0,20)
pLOI291	1,0 (0,1)	15 (0,5)	7 (0,2)	4 (0,5)	pLOI292	2,3 (0,2)
pLOI308-2	0,8 (0,1)	7 (0,5)	4 (0,3)	71 (5)	pLOI308-5	0,3 (0,1)
pLOI308-10	5,0 (0,4)	10 (1)	1,2 (0,2)	482 (23)	pLOI295	2,2 (0,20)
pLOI291	1,0 (0,1)	15 (0,5)	7 (0,2)	4 (0,5)	pLOI292	2,3 (0,2)
pLOI308-2	0,8 (0,1)	7 (0,5)	4 (0,3)	71 (5)	pLOI308-5	0,3 (0,1)
pLOI308-10	5,0 (0,4)	10 (1)	1,2 (0,2)	482 (23)	pLOI295	2,2 (0,20)
pLOI291	1,0 (0,1)	15 (0,5)	7 (0,2)	4 (0,5)	pLOI292	2,3 (0,2)
pLOI308-2	0,8 (0,1)	7 (0,5)	4 (0,3)	71 (5)	pLOI308-5	0,3 (0,1)
pLOI308-10	5,0 (0,4)	10 (1)	1,2 (0,2)	482 (23)	pLOI295	2,2 (0,20)
pLOI291	1,0 (0,1)	15 (0,5)	7 (0,2)	4 (0,5)	pLOI292	2,3 (0,2)
pLOI308-2	0,8 (0,1)	7 (0,5)	4 (0,3)	71 (5)	pLOI308-5	0,3 (0,1)
pLOI308-10	5,0 (0,4)	10 (1)	1,2 (0,2)	482 (23)	pLOI295	2,2 (0,20)
pLOI291	1,0 (0,1)	15 (0,5)	7 (0,2)	4 (0,5)	pLOI292	2,3 (0,2)
pLOI308-2	0,8 (0,1)	7 (0,5)	4 (0,3)	71 (5)	pLOI308-5	0,3 (0,1)
pLOI308-10	5,0 (0,4)	10 (1)	1,2 (0,2)	482 (23)	pLOI295	2,2 (0,20)
pLOI291	1,0 (0,1)	15 (0,5)	7 (0,2)	4 (0,5)	pLOI292	2,3 (0,2)
pLOI308-2	0,8 (0,1)	7 (0,5)	4 (0,3)	71 (5)	pLOI308-5	0,3 (0,1)
pLOI308-10	5,0 (0,4)	10 (1)	1,2 (0,2)	482 (23)	pLOI295	2,2 (0,20)
pLOI291	1,0 (0,1)	15 (0,5)	7 (0,2)	4 (0,5)	pLOI292	2,3 (0,2)
pLOI308-2	0,8 (0,1)	7 (0,5)	4 (0,3)	71 (5)	pLOI308-5	0,3 (0,1)
pLOI308-10	5,0 (0,4)	10 (1)	1,2 (0,2)	482 (23)	pLOI295	2,2 (0,20)
pLOI291	1,0 (0,1)	15 (0,5)	7 (0,2)	4 (0,5)	pLOI292	2,3 (0,2)
pLOI308-2	0,8 (0,1)	7 (0,5)	4 (0,3)	71 (5)	pLOI308-5	0,3 (0,1)
pLOI308-10	5,0 (0,4)	10 (1)	1,2 (0,2)	482 (23)	pLOI295	2,2 (0,20)
pLOI291	1,0 (0,1)	15 (0,5)	7 (0,2)	4 (0,5)	pLOI292	2,3 (0,2)
pLOI308-2	0,8 (0,1)	7 (0,5)	4 (0,3)	71 (5)	pLOI308-5	0,3 (0,1)
pLOI308-10	5,0 (0,4)	10 (1)	1,2 (0,2)	482 (23)	pLOI295	2,2 (0,20)
pLOI291	1,0 (0,1)	15 (0,5)	7 (0,2)	4 (0,5)	pLOI292	2,3 (0,2)
pLOI308-2	0,8 (0,1)	7 (0,5)	4 (0,3)	71 (5)	pLOI308-5	0,3 (0,1)
pLOI308-10	5,0 (0,4)	10 (1)	1,2 (0,2)	482 (23)	pLOI295	2,2 (0,20)
pLOI291	1,0 (0,1)	15 (0,5)	7 (0,2)	4 (0,5)	pLOI292	2,3 (0,2)
pLOI308-2	0,8 (0,1)	7 (0,5)	4 (0,3)	71 (5)	pLOI308-5	0,3 (0,1)
pLOI308-10	5,0 (0,4)	10 (1)	1,2 (0,2)	482 (23)	pLOI295	2,2 (0,20)
pLOI291	1,0 (0,1)	15 (0,5)	7 (0,2)	4 (0,5)	pLOI292	2,3 (0,2)
pLOI308-2	0,8 (0,1)	7 (0,5)	4 (0,3)	71 (5)	pLOI308-5	0,3 (0,1)
pLOI308-10	5,0 (0,4)	10 (1)	1,2 (0,2)	482 (23)	pLOI295	2,2 (0,20)
pLOI291	1,0 (0,1)	15 (0,5)	7 (0,2)	4 (0,5)	pLOI292	2,3 (0,2)
pLOI308-2	0,8 (0,1)	7 (0,5)	4 (0,3)	71 (5)	pLOI308-5	0,3 (0,1)
pLOI308-10	5,0 (0,4)	10 (1)	1,2 (0,2)	482 (23)	pLOI295	2,2 (0,20)
pLOI291	1,0 (0,1)	15 (0,5)	7 (0,2)	4 (0,5)	pLOI292	2,3 (0,2)
pLOI308-2	0,8 (0,1)	7 (0,5)	4 (0,3)	71 (5)	pLOI308-5	0,3 (0,1)
pLOI308-10	5,0 (0,4)	10 (1)	1,2 (0,2)	482 (23)	pLOI295	2,2 (0,20)
pLOI291	1,0 (0,1)	15 (0,5)	7 (0,2)	4 (0,5)	pLOI292	2,3 (0,2)
pLOI308-2	0,8 (0,1)	7 (0,5)	4 (0,3)	71 (5)	pLOI308-5	0,3 (0,1)
pLOI308-10	5,0 (0,4)	10 (1)	1,2 (0,2)	482 (23)	pLOI295	2,2 (0,20)
pLOI291	1,0 (0,1)	15 (0,5)	7 (0,2)	4 (0,5)	pLOI292	2,3 (0,2)
pLOI308-2	0,8 (0,1)	7 (0,5)	4 (0,3)	71 (5)	pLOI308-5	0,3 (0,1)
pLOI308-10	5,0 (0,4)	10 (1)	1,2 (0,2)	482 (23)	pLOI295	2,2 (0,20)
pLOI291	1,0 (0,1)	15 (0,5)	7 (0,2)	4 (0,5)	pLOI292	2,3 (0,2)
pLOI308-2	0,8 (0,1)	7 (0,5)	4 (0,3)	71 (5)	pLOI308-5	0,3 (0,1)
pLOI308-10	5,0 (0,4)	10 (1)	1,2 (0,2)	482 (23)	pLOI295	2,2 (0,20)
pLOI291	1,0 (0,1)	15 (0,5)	7 (0,2)	4 (0,5)	pLOI292	2,3 (0,2)
pLOI308-2	0,8 (0,1)	7 (0,5)	4 (0,3)	71 (5)	pLOI308-5	0,3 (0,1)
pLOI308-10	5,0 (0,4)	10 (1)	1,2 (0,2)	482		

condições aeróbicas. É provável que esse menor nível de etanol acumulado tenha sido causado pela redução na massa celular total produzida sob essas condições anaeróbicas, reduzindo assim a taxa volumétrica de produção de etanol.

- 696 A extensão da produção de etanol sob condições anaeróbicas e aeróbicas (Tabela 3) foi diretamente relacionada ao nível de expressão dos genes etanologênicos de *Z. mobilis* (Tabela 1). A produção de etanol pareceu ser ótima na cepa TC4(pLOI308-10), com atividade de piruvato descarboxilase de 6 UI e atividade de álcool desidrogenase II de 2,5 UI.
- 703 Derivados de *E. coli* TC4 contendo plasmídeos que expressam as enzimas etanologênicas de *Z. mobilis* cresceram até densidades celulares mais altas do que o organismo parental sem um plasmídeo. O aumento na densidade celular final, a extensão em que o etanol se acumulou no meio e a redução na taxa de acidificação do caldo de cultura durante o crescimento correlacionaram-se com o nível de expressão das enzimas etanologênicas de *Z. mobilis*. Promotores heterólogos foram usados para expressar os genes em todas as construções, exceto pLOI295 (lac), para minimizar potenciais problemas associados à regulação transcricional. O nível de expressão mais próximo do ideal para crescimento e produção de etanol foi fornecido por pLOI308-10 (6,5 UI de piruvato descarboxilase e 2,5 UI de álcool desidrogenase II por mg de proteína celular total). Este nível de expressão em *E. coli* é consideravelmente maior do que aquele presente em *Z. mobilis* CP4, que contém apenas a via do etanol para a regeneração de NAD⁺.
- 715 O nível de expressão de enzimas etanologênicas pareceu ser excessivo na cepa TC4(pLOI295) (aproximadamente 17% da proteína celular solúvel). Esse alto nível de expressão foi acompanhado por lise celular parcial, crescimento mais lento e redução na produção de etanol em condições aeróbicas. Esses efeitos foram reduzidos pela agitação mais lenta e pelo crescimento em condições anaeróbicas. O dano aparente e a lise parcial que ocorreram durante o crescimento altamente aeróbico podem ter sido relacionados à depleção de NADH por uma combinação de altos níveis de álcool desidrogenase II de *Z. mobilis* e da NADH oxidase nativa (acoplada ao sistema de transporte de elétrons).
- 723 A produção de etanol como produto principal não parece afetar negativamente a taxa de crescimento de *E. coli* TC4. As cepas contendo derivados de pLOI308 (répicon ColE1) expressando o operon pet e produzindo etanol cresceram tão rapidamente quanto o organismo parental em condições aeróbicas com glicose e atingiram densidades celulares finais mais altas do que o organismo parental. As cepas contendo pLOI291 ou pLOI292 com o replicon RSF1010 cresceram mais lentamente em condições aeróbicas. Como essas duas construções expressaram níveis mais baixos de enzimas etanologênicas e produziram menos etanol do que pLOI308-10, as razões para o crescimento mais lento podem ser atribuídas às propriedades do vetor e não à expressão do operon pet.

732 EXEMPLO 8

733 Preparação de cepas adicionais

- 734 Cepas adicionais de *E. coli* foram testadas para tentar identificar bactérias com características superiores para uso como micróbio produtor de etanol. As seguintes cepas de *E. coli* foram avaliadas: ATCC 8677, ATCC 8739, ATCC 9637, ATCC 11303, ATCC 11775, ATCC 14948, ATCC 15244 e ATCC 23227. Eles foram cultivados em banho-maria com agitação a 30 °C em

caldo Luria (Luria, S. E. e M. Delbruck [1943] Genetics 28:491-511) contendo triptona (10 g/litro), extrato de levedura (5 g/litro), cloreto de sódio (5 g/litro) e um açúcar fermentável. Glicose e lactose foram adicionadas na concentração de 100 g/litro e xilose na concentração de 80 g/litro, salvo indicação em contrário. Os açúcares foram autoclavados separadamente (121 °C, 15 min), com concentração dupla em água destilada. Soluções de xilose (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) eram ácidas e foram neutralizadas com hidróxido de sódio antes da autoclavagem; a falha na neutralização resultou em escurecimento e decomposição extensos. Resultados de fermentação semelhantes foram obtidos com açúcares autoclavados ou esterilizados por filtração.

742 A sobrevivência em caldo e em placas de cepas recombinantes contendo genes que codificam as enzimas da via do etanol exigiu a presença de um açúcar fermentável. Quando indicado, a tetraciclina foi adicionada na concentração final de 10 mg/litro.

754 EXEMPLO 9

755 Resistência ambiental de cepas adicionais

756 Antes da introdução de plasmídeos para produção de etanol, o crescimento de 8 cepas diferentes de E. coli previamente identificadas foi comparado quanto à resistência ambiental. As cepas foram testadas quanto à resistência ao cloreto de sódio, açúcares, pH baixo e etanol. As concentrações de cloreto de sódio e açúcares na Tabela 4 incluem aquelas presentes no meio original. O pH original do meio era 6,8; este foi ajustado para valores mais baixos com HCl quando indicado. Os meios acidificados foram esterilizados por filtração. Etanol foi adicionado ao meio autoclavado após o resfriamento. Os açúcares foram autoclavados separadamente. Culturas cultivadas durante a noite em cada açúcar respectivo na ausência do agente de teste foram diluídas 60 vezes em tubos de cultura de 13,75 mm contendo 3 ml de meio de teste. O crescimento foi medido como DO a 550 nm após 48 horas. Uma DO de 1,0 é equivalente a 0,25 mg/ml de proteína celular e 0,33 mg de peso seco celular. Em testes de resistência ambiental, um O.D. final abaixo de 0,2 refletiu menos de duas duplicações e foi considerado insignificante.

769 A Tabela 4 resume esses resultados em meio contendo glicose. Resultados semelhantes foram obtidos em meio contendo lactose ou xilose. As cepas ATCC 8677, ATCC 8739 e ATCC 11775 foram particularmente sensíveis à inibição por baixas concentrações de etanol. As cepas ATCC 9637 e ATCC 11775 foram as mais resistentes ao pH baixo, embora todas as cepas tenham crescido por pelo menos 2 a 4 duplicações em pH 4,0, exceto ATCC 23227. Todas as cepas cresceram a 45 °C, com crescimento limitado em temperaturas mais altas; nenhuma pôde ser subcultivada acima de 45 °C. Todas as cepas cresceram em meios contendo 20% de glicose, 20% de lactose ou 12% de xilose. TABELA 4

Crescimento de E. coli em caldo Luria contendo 100 g/l de glicose sob estresses químicos e físicos. Crescimento de cepas de E. coli (números ATCC) Estresse 8677 8739 9637 11303 11775 14948 15224 23227

NaCl (g/l) 50 + ++ ++ ++ ++ ++ ++ ++ 60 0 + ++ ++ + ++ + ++ 70 0 0 + + 0 + + + Etanol (% por vol.) 3,8 ++ ++ ++ ++ ++ ++ ++ ++ 5,0 ++ ++ + + + + + + 6,3 0 ++ + + + + + 0 7,5 0 + + 0 0 + 0

799 EXEMPLO 10

806 Utilização de açúcar de cepas adicionais

815 Todas as cepas testadas utilizaram glicose, frutose, galactose, manose, arabinose, lactose, ácido glicurônico e ácido galacturônico. A cepa 11775 não utilizou xilose. Maltose e maltotriose não foram usadas pela ATCC 11303 e ATCC 23227. Todas as cepas apresentaram uma reação positiva fraca com celobiose. Somente a cepa ATCC 9637 utilizou sacarose. Os resultados dos estudos de utilização de açúcar são mostrados na Tabela 5.

Glicose nenhuma 4,0 3,7 6,1 6,0 4,7 5,6 7,0 6,6 Glicose pLOI297 10,0 10,5 10,5 10,0 9,5 --
9,5 10,2 Glicose pLOI308-11 9,8 9,5 11,4 11,2 -- 9,3 10,8 11,4 Lactose nenhuma 4,3 3,8 7,5
6,0 4,5 6,1 7,0 6,4 Lactose pLOI297 13,0 6,8 11,6 10,8 7,6 -- 10,5 7,0 Lactose pLOI308-11
10,0 10,0 11,5 11,0 -- 7,3 10,0 10,0 Xilose nenhum 4,1 3,7 7,7 7,3 4,9 5,9 7,2 7,0 Xilose
pLOI297 8,1 10,6 10,8 10,6 4,7 -- 11,0 11,0 Xilose pLOI308-11 10,0 6,8 11,4 8,5 -- 11,4 10,6
12,0

As linhas

833 EXEMPLO 11

14-09-2024 18

(Ingram e Conway [1988], supra) e inserido no sítio EcoRI de pBR322 para produzir pLOI308-11. O plasmídeo pLOI297 foi construído pela inserção do fragmento EcoRI de 2,6 kb de pCOS2EMBL (Poustka, A., H. R. Rackwitz, A.-M. Firschauf e H. Lehrach [1984] Proc. Nacional. Acadêmico. Ciência. EUA 81:4129-4133) contendo o gene de resistência à tetraciclina no sítio Sall de pLOI295 (Ingram et al. [1987], supra). As extremidades coesivas foram removidas pelo tratamento com o fragmento Klenow da DNA polimerase de *E. coli* (Maniatis et al., supra), antes da ligação.

847 Os plasmídeos foram introduzidos nas diferentes cepas de *E. coli* por transformação usando o procedimento de cloreto de cálcio de Mandel e Higa (Mandel, M. e A. Higa [1970] J. Mol. Biologia. 53:159-162). As seleções foram feitas em meio sólido contendo 2% de glicose e tetraciclina. A estabilidade do plasmídeo é expressa como a porcentagem de células que retêm marcadores antibióticos após 25 gerações de crescimento na ausência de seleção de antibióticos.

860 Cepas recombinantes contendo plasmídeos com genes para produção de etanol cresceram como colônias anormalmente grandes que ficaram amarelas após 24 a 48 horas em meio sólido contendo açúcar fermentável. Em meio líquido, as densidades celulares finais desses recombinantes foram duas a três vezes maiores que as do controle sem o plasmídeo. Nenhum transformante foi obtido após várias tentativas de ATCC 14948 com pLOI297 ou de ATCC 11775 com pLOI308-11. A cepa ATCC 11775 não utilizou xilose e os recombinantes dessa cepa não cresceram até densidades maiores do que o controle com xilose como açúcar fermentável, embora um crescimento maior tenha sido observado com lactose e glicose.

868 A estabilidade do plasmídeo foi examinada após o crescimento em meio contendo glicose por 25 gerações (Tabela 6). Ambos os plasmídeos continham os mesmos replicons e foram mantidos bem em todas as cepas, exceto ATCC 8677 e ATCC 8739. TABELA 6

Estabilidade de pLOI297 e pLOI308-11 após 25 gerações de crescimento com glicose na ausência de seleção de antibióticos. Células que retêm o plasmídeo (%) Cepa ATCC											
pLOI297	pLOI308-11	8677	75	85	8739	44	47	9637	100	90	11303
98	98	11775	100	--	14948	--	97	15224	99	100	23227
91	100										

As linhas tracejadas indicam que não há dados disponíveis.

878 EXEMPLO 12

879 Expressão da atividade da piruvato descarboxilase em linhagens geneticamente alteradas

880 A atividade da piruvato descarboxilase foi medida conforme descrito anteriormente (Conway et al. [1987], supra; Neale et al. [1987], supra), exceto que as células foram coletadas em uma DO de 4,0, aproximadamente metade do crescimento máximo.

883 A expressão da atividade da piruvato descarboxilase de *Z. mobilis* foi examinada após o crescimento na presença de tetraciclina (Tabela 7). Com pLOI297, os genes de *Z. mobilis* são expressos sob o controle do promotor lac de *E. coli*; pLOI308-11 utiliza um promotor críptico de *Z. mobilis* para expressão do operon PET. As cepas ATCC 11303 (pLOI297), ATCC 11775 (pLOI297) e ATCC 15224 (pLOI297) continham os maiores níveis de atividade. TABELA 7

Expressão da piruvato descarboxilase de *Z.*

_____ 8677 5,7 6,0 8739 0,8 1,4 9637 1,1 1,4 11303
16,7 2,1 11775 17,1 --@b 14948 --@b 2,5 15224 16,3 1,8 23227 2,3 1,7

_____ @a Atividade em I.U./mg de proteína celular.

@b As linhas tracejadas indicam que não há dados disponíveis.

895 EXEMPLO 13

902 Produção de etanol de linhagens geneticamente alteradas

903 O caldo Luria foi modificado para experimentos de fermentação pela inclusão de tampão fosfato de potássio (pH 7,0) em uma concentração final de 0,2 M. O tampão fosfato, os componentes complexos do meio e os açúcares foram autoclavados separadamente e misturados após o resfriamento. A tetraciclina foi incluída na concentração de 10 mg/litro. Os inóculos foram cultivados a partir de colônias recém-isoladas por 24 horas, lavados no meio de fermentação a ser testado e adicionados a uma D.O. inicial de 550 nm de aproximadamente 1,0. As fermentações foram realizadas a 30 °C ou 37 °C em balões volumétricos de 100 ml contendo 80 ml de caldo, equipados com septos de borracha e agulhas de calibre 25 para permitir o escape dos gases. Os balões de fermentação foram imersos em banho-maria com temperatura controlada e agitados por um agitador magnético a 100 rpm.

⁹¹⁴ A concentração de etanol foi medida por cromatografia gasosa, conforme descrito anteriormente (Dombek, K. M. e L. O. Ingram [1985] Appl. Meio ambiente. Microbiol. 51:197-200) e é expresso como porcentagem por volume. A eficiência de conversão foi calculada com base no açúcar adicionado, assumindo que 100% de eficiência resulta na produção de 12,75 ml de etanol (10,2 g) por 20 g de glicose ou xilose e 13,5 ml de etanol (10,8 g) por 20 g de lactose.

920 Todas as cepas geneticamente modificadas de *E. coli* produziram quantidades significativas de etanol a partir de açúcares (Tabela 8). Experimentos preliminares com a cepa ATCC 15244 (pLOI297) indicaram que níveis mais elevados de etanol foram produzidos em meio contendo tampão fosfato de potássio 0,2 M (pH 7,0). Espera-se que resultados semelhantes ou superiores sejam obtidos usando um ajuste automático de pH no lugar deste tampão. Com 15% de glicose, níveis mais elevados de etanol foram produzidos a 30 °C do que a 37 °C após 48 horas. A fermentação de lactose e xilose foi examinada apenas na temperatura mais baixa, 30 °C. Em geral, níveis mais altos de etanol foram produzidos por cepas contendo pLOI297 do que com pLOI308-11. As cepas ATCC 11303 (pLOI297), ATCC 11775 (pLOI297) e ATCC 15224 (pLOI297) produziram os maiores níveis de etanol após 48 horas a partir de 15% de glicose, 5,8% a 6,9% em volume. A maioria das cepas foi menos tolerante à xilose nos experimentos iniciais e as comparações de fermentação foram realizadas usando 8% de xilose.

933 As estirpes ATCC 9637 (pLOI297), ATCC 11303 (pLOI297) e ATCC 15224 (pLOI297) produziram os maiores níveis de etanol (4,8% a 5,2%) a partir de 8% de xilose após 72 horas. Todas as cepas cresceram bem em 15% de lactose. As cepas ATCC 11303 (pLOI297) e ATCC 15224 (pLOI297) produziram os maiores níveis de etanol a partir da lactose após 48

horas, 6,1% e 5,6%, respectivamente. TABELA 8

Etanol produzido na fermentação em batelada a partir de glicose (48 horas), xilose (72 horas) e lactose (48 horas) por cepas de E. coli contendo pLOI297 e pLOI308-11. Etanol (% , v/v) produzido por cepas de E. coli (números ATCC) Carboidrato Plasmídeo 8677 8739 9637 11303 11775 14948 15224 23227

15% de glicose pLOI297@a 2,4 4,7 4,2 4,3 4,8 -- 4,8 0,9 15% de glicose pLOI308-11@a 3,6 1,4 2,1 1,3 -- 3,4 2,8 1,3 15% glicose pLOI297@b 3,2 4,7 4,1 5,8 6,9 -- 6,1 3,1 15% glicose pLOI308-11@b 5,8 5,0 3,5 1,5 -- 3,8 3,0 3,2 15% lactose pLOI297@b 2,3 4,4 5,3 6,1 4,5 -- 5,6 3,7 15% lactose pLOI308-11@b 2,3 2,1 3,4 0,9 -- 2,9 2,7 3,0 8% xilose pLOI297@b 0,9 4,1 4,8 5,2 -- -- 4,8 1,2 8% xilose pLOI308-11@b 2,0 2,8 2,8 1,2 -- 2,0 3,5 1,0

As linhas tracejadas indicam que não há dados disponíveis. @a Incubado a 37 °C. @b Incubado a 30 °C.

- 941 Com base nesses estudos comparativos, as cepas ATCC 11303 (pLOI297) e ATCC 15224 (pLOI297) pareceram ser as melhores construções para a produção de etanol. O curso temporal do crescimento e a produção de etanol foram examinados com ambas as cepas em 12% de glicose, 12% de lactose e 8% de xilose (FIG. 1). A massa celular aumentou aproximadamente 10 vezes, atingindo uma densidade final de 3,6 g de peso seco/litro. Com xilose, a massa celular aumentou na metade da taxa observada com glicose ou lactose. A produção e o crescimento de etanol foram aproximadamente lineares para os três açúcares até que a concentração de etanol atingiu 5%.
- 964 Para calcular a eficiência de conversão de açúcar em etanol, as concentrações finais de etanol após 120 horas foram calculadas em média a partir de três conjuntos de experimentos (Tabela 6). A concentração final de etanol em culturas cultivadas com 12% de glicose foi de 7,2% (em vol.), representando 94% do rendimento teórico de glicose. Com 12% de lactose, a concentração final de etanol foi de 6,5%, 80% do rendimento teórico da lactose. Com 8% de xilose, obtivemos consistentemente rendimentos de 100% e superiores. Esses altos rendimentos durante o crescimento mais lento com xilose podem refletir a conversão de piruvato do catabolismo de nutrientes complexos em etanol, além do piruvato da glicose.
- 972 A taxa de produção de etanol foi calculada a partir dos gráficos da FIG. 1 e estão resumidos na Tabela 9. A produtividade volumétrica do etanol variou de 1,4 g/litro por hora para glicose a 0,64 g/litro por hora para xilose. A produtividade específica do etanol foi maior durante o período de crescimento inicial para cada um dos três açúcares. A maior produtividade foi obtida com glicose, 2,1 g de etanol/g de peso seco de células por hora. O maior rendimento de etanol por g de açúcar foi obtido com xilose, excedendo o rendimento teórico máximo para açúcar sozinho. TABELA 9

Parâmetros cinéticos médios para produção de etanol por ATCC 11303(pLOI297) e ATCC 15224(pLOI297). Volumetric@a Específico@b Produtividade do Açúcar Produtividade Rendimento@c Eficiência@d Etanol@e

12% glicose 1,4 2,1 0,48 95% 58 12% lactose 1,3 2,0 0,43 80% 52 8% xilose 0,6 1,3 0,52
102% 42

@a g etanol/litro por hora @b g etanol/g peso seco da célula por hora @c g etanol/g açúcar
@d etanol produzido/máximo teórico a partir do substrato de açúcar .vezes. 100 @e
concentração final de etanol em g/litro

- 994 Experimentos foram conduzidos com ATCC 11303 (pLOI297) para examinar a produção de etanol a partir de arabinose, galactose e manose. Concentrações de etanol de 3% a 4% foram obtidas após 48 horas a 30 °C, mas não foram investigadas posteriormente. Esses açúcares foram metabolizados por vias semelhantes às da glicose e da xilose e seria esperado que produzissem rendimentos análogos (Lin, E.C.C. [1987] "Dissimilatory pathways for sugars, polyols, and carboxylates," In F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik e M. Schaechter [eds], *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*, Vol. 1, pp. 244-284. Sociedade Americana de Microbiologia, Washington, D.C.).
- 1009 Deve ser entendido que os exemplos e as modalidades aqui descritos são apenas para fins ilustrativos e que várias modificações ou alterações à luz dos mesmos serão sugeridas a pessoas qualificadas na arte e devem ser incluídas dentro do espírito e do escopo desta aplicação e do escopo das reivindicações anexas.