



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0709540-6 A2**

(22) Data de Depósito: 13/02/2007
(43) Data da Publicação: 19/07/2011
(RPI 2115)



(51) Int.Cl.:
C12N 15/52 2006.01
C07K 14/245 2006.01
C12P 9/00 2006.01
C12P 23/00 2006.01
C12P 7/04 2006.01

(54) Título: **MÉTODO PARA PRODUZIR TERPENOS E, PORTANTO, MICROORGANISMOS TRANSFORMADOS POR MEP**

(30) Prioridade Unionista: 14/02/2006 IB PCTIB2006050476

(73) Titular(es): Firmenich SA

(72) Inventor(es): Anthony Clark, Jens Nielsen, Jérôme Maury, Kasper Moller, Michel Schalk, Mohammad Ali Asadollahi

(74) Procurador(es): Guerra Adv

(86) Pedido Internacional: PCT IB2007050474 de 13/02/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/093962 de 23/08/2007

(57) Resumo: MÉTODO PARA PRODUZIR TERPENOS E, PORTANTO, MICROORGANISMOS TRANSFORMADOS POR MEP. A presente invenção se relaciona com um microorganismo capaz de produzir um terpeno de escolha. O microorganismo expressa uma via heteróloga para a formação de unidades de isopreno e, preferivelmente, uma terpeno sintase heteróloga. Desta forma, altas quantidades de terpeno podem ser isoladas a partir do meio do microorganismo.



MÉTODO PARA PRODUZIR TERPENOS E, PORTANTO, MICROORGANISMOS TRANSFORMADOS POR MEP

Campo técnico

O presente invento relaciona-se com os microorganismos que têm uma via heteróloga para produzir isopentenil-difosfato e/ou dimetilalil-difosfato, e com um método para acumular um terpenóide em uma célula e/ou em um meio.

Arte de fundamento

Os isoprenóides (também conhecidos como terpenóides ou terpenos) são um grupo grande, diverso, de produtos naturais complexos com considerável interesse comercial. Os isoprenóides são, hoje na maior parte, extraídos de plantas ou quimicamente sintetizados para serem usados como produtos farmacêuticos (por exemplo, taxol, bisabolol, licopeno, artemisinina), suplementos alimentares para animais e corantes (vários carotenóides) ou sabores e fragrâncias alimentícios (por exemplo; mentol, patchoulol, nootkatona). Os isoprenóides são construídos a partir de unidades de isopreno (2-metil-1,3-butadieno), e o precursor biológico para todos os isoprenóides naturais é o isopentenil difosfato (IPP). Os isoprenóides desempenham importantes papéis nas células vivas, tais como regulação hormonal (esteróis), fotossíntese (carotenóides e outros), somente para mencionar alguns.

Nas células vivas, o IPP pode ser gerado através da via dependente de mevalonato (doravante MEV) ou independente de mevalonato ou via de MEP, as quais são duas vias distintas. A maioria dos organismos conta exclusivamente com uma das vias para geração de compostos isoprenóides, mas as plantas e alguns microorganismos têm ambas as vias. O precursor para síntese de IPP através da via do MEV é a acetil-CoA, a qual é sintetizada no metabolismo central de carbono. Os precursores para a síntese de IPP através da via do MEP são os intermediários glicolíticos

gliceraldeído-3-fostato (GAP) e piruvato (PYR), os quais são sintetizados no metabolismo central de carbono. Tanto a via do mevalonato quanto a via do MEP produzem dimetilalil difosfato (DMAPP) e IPP, e as etapas da reação após o IPP produzir geranyl difosfato (GPP), farnesil difosfato (FPP) e geranylgeranyl difosfato (GGPP) são as mesmas nas células que usam a via do mevalonato, a via do MEP ou ambos. É a partir desses intermediários que os vários compostos isoprenóides na natureza são produzidos.

A indústria química, que produz moléculas orgânicas através dos processos químicos tradicionais, está progressivamente se voltando para os processos de produção que utilizam fábricas de células microbianas. Os determinantes para esse desenvolvimento em direção à química verde são aqueles chamados “processos biotecnológicos” são mais ambientalmente amigáveis, que muitos compostos produzidos por microorganismos são tão complexos para serem obtidos por síntese orgânica e que a fábrica de células microbianas representa um fornecimento ilimitado do composto em particular. Atualmente, os isoprenóides são produzidos em larga escala através da extração de plantas ou por síntese química. A principal desvantagem de ambos os métodos são os baixos rendimentos e os altos custos. Uma terceira opção é produzir os isoprenóides desejados através da conversão enzimática *in vitro*, mas esta abordagem está limitada pela disponibilidade de precursores e, portanto, na maioria dos casos, não é economicamente viável.

A engenharia metabólica de microorganismos para produção de isoprenóides pode levar à produção de grandes quantidades de isoprenóides a partir de fontes baratas de carbono em processos de fermentação e, a partir disso, resolver muitos dos atuais problemas na produção industrial de isoprenóides (Maury et al., 2005, Adv. Biochem. Engin/Biotechnol. 100:19), no momento em que se leva em conta a

exploração biotecnológica da grande diversidade encontrada no grupo isoprenóide dos compostos naturais.

Inúmeros produtos isoprenóides têm sido produzidos por microorganismos geneticamente engenheirados, incluindo limoneno (Carter et al., 2003, *Phytochem.* 5 64:425), carotenóides (Kajiwara et al, 1997, *Biochem. J.* 324: 421), epicedrol (Jackson et al, 2003, *Org. Lett* 5: 1629), taxadieno (Huang et al, 2001, *Biorg. Med. Chem* 9: 2237) e outros. Com o objetivo de ampliar a produção de isoprenóides em *E. coli*, os genes *dxs* (codificando DXP sintase), *dxr* (DXP redutoisomerase) e *idi* (IPP isomerase) têm sido superexpressa com bons resultados para vários dos 10 produtos isoprenóides acima mencionados (revisado em Maury et al., 2005). Um aumento maior na produção de amorfadieno por *E. coli* tem sido obtido expressando a via do mevalonato a partir de *S. cerevisiae* em uma cepa de *E. coli* produtora de amorfadieno (Martin et al., 2003, *Nat. Biotechnol.* 21:796). Alguns compostos isoprenóides têm sido produzidos em leveduras, incluindo epicedrol em *S. cerevisiae* 15 (Jackson et al., 2003, *Org. Lett.* 5:1629), licopeno e beta-caroteno em *S. cerevisiae* (Yamano et al., 1994, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58:1112) e em *Candida utilis* (Miura et al., 1998, *Appl. Environ. Microbiol.* 64:1226). Em vários casos, demonstrou-se que a produção de isoprenóides em levedura foi ampliada pela superexpressão de *HMG1* (codificando HMG-CoA redutase) (revisado em Maury et al., 2005).

20 Apesar do fundamento descrito acima, ainda há necessidade de processos adicionais para produzir terpenos e terpenóides e, em particular, de modos para acumular terpenos em microorganismos com rendimentos mais altos e de maneira menos custosa e levando menos tempo que nos métodos anteriormente conhecidos. Portanto, é um objetivo da presente invenção fornecer um método para produzir 25 terpenos ou terpenóides que atendam a esta necessidade.

É um objetivo adicional da presente invenção, resolver o problema do fornecimento de quantidades suficientes de precursores do terpeno em um organismo, de forma que se amplie o acúmulo de terpenos no organismo.

É um objetivo particular da presente invenção, produzir um microorganismo
5 que acumule e/ou secrete altas quantidades de terpenos para o meio circundante. A produção de terpenos por um tal microorganismo é preferivelmente estável ao longo do tempo.

Ainda um objetivo adicional subjacente à presente invenção é fornecer uma plataforma biológica para a produção de terpenos que seja capaz de produzir
10 qualquer terpeno de escolha do fabricante. Tal sistema único permitiria, a princípio, a produção de um terpeno específico a cada vez, mas poderia ser facilmente modificado para produzir um outro terpeno ou uma mistura de terpenos. O mesmo sistema poderia ser usado, claro, para produzir diferentes terpenos independentemente. Além disso, tal plataforma também poderia permitir a produção
15 de compostos derivados de terpeno que sejam úteis para a indústria de flavorizantes e fragrâncias. Um exemplo particular que não é limitante da invenção é a produção de nootkatona a partir do valenceno.

Além do mais, a plataforma de produção biológica para terpenos da invenção preferivelmente tem alta capacidade de produção e está livre de endotoxinas e de
20 todos os problemas associados a elas.

Um objetivo adicional da presente invenção é fornecer uma plataforma de produção biológica altamente capaz de acumular altos níveis de compostos lipofílicos, mesmo em um meio geralmente aquoso onde tais compostos, ou seus precursores, não são normalmente solúveis.

Divulgação da invenção

Notadamente, os presentes inventores transformaram, com sucesso e estavelmente, um microorganismo com uma via do MEP heteróloga. O microorganismo não possui uma via do MEP para a produção de terpenos em seu estado natural e é engenheirado para adquirir tal via. O microorganismo exibe alta produção de um composto terpeno de escolha durante o cultivo do microorganismo em um meio adequado. Surpreendentemente, o microorganismo transformado é capaz de produzir quantidades aumentadas de qualquer terpeno selecionado quando comparado com sua capacidade, antes de tal transformação, de produzir o dito terpeno.

Conseqüentemente, em um primeiro aspecto, a presente invenção fornece um microorganismo eucariótico que tem uma via do MEP heteróloga para converter 1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato (DXP) em isopentenil difosfato (IPP) e/ou dimetilalil difosfato (DMAPP).

O termo “via metabólica heteróloga” é definido neste documento como uma via metabólica que é introduzida no microorganismo do tipo selvagem para produzir o microorganismo recombinante, um metabolismo que não estava presente no genoma natural do microorganismo do tipo selvagem, isto é, que não era “nativo” àquele microorganismo naturalmente.

O microorganismo preferido da invenção é um fungo, mais particularmente uma levedura do gênero *Saccharomyces*.

A arte anterior é omissa quanto à transformação de um microorganismo conforme presentemente declarado. Os fungos e leveduras presentes na natureza são desprovidos da via do MEP para a produção de terpenos. Eles produzem terpenos através de uma via dependente do mevalonato, a qual não usa 1-deoxi-D-

xilulose 5 fosfato (DXP) como precursor de IPP e/ou DMAPP.

A introdução de uma via dependente do mevalonato em uma bactéria, a qual pode ou não possuir uma naturalmente, tem sido descrita por K. Reiling et al. no WO 2005/033287 A1. Estes autores também sugerem geralmente a possibilidade de
5 modificar as células de levedura para integrar nestas as enzimas da via do DXP. Este documento é, entretanto, inteiramente omissivo quanto à maneira pela qual tal transformação pode ser alcançada e, portanto, não fornece nenhum ensinamento útil para chegar à presente invenção. De fato, sem ensinamento específico da maneira pela qual tal transformação é alcançada, é impossível prever o resultado de tal
10 tentativa. A via do MEP envolve um grande número de enzimas, cada uma específica para apenas um substrato em particular, e a introdução de todas as enzimas juntas, de uma maneira estável, de modo a fornecer um microorganismo recombinante capaz de produzir quantidades aumentadas de IPP e/ou DMAPP e, assim, quantidades aumentadas dos terpenos desejados, é muito difícil de alcançar.
15 Os presentes inventores fornecem neste documento uma solução surpreendente para esse problema.

No WO 00/01649 A1, J. Millis et al. sugerem que é possível introduzir, em cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, duas enzimas da via do MEP de *E. coli*, os genes *dxs* e *dxr*. Novamente, não há nenhuma descrição específica da maneira pela
20 qual isto pode ser alcançado, e há até uma afirmação desconcertante para o efeito de que o precursor de MEP possivelmente obtido de tal transformação pode, então, ser mais metabolizado pelo microorganismo engenheirado via enzimas endógenas. Sabe-se, ainda, que *Saccharomyces cerevisiae* não possui tais enzimas endógenas e, sem uma orientação específica para esse efeito, é aparente o que os autores
25 tinham em mente. É claro, entretanto, que nenhuma transformação assim foi

realizada e não é aparente como seria possível realizar da maneira sugerida.

Outra arte anterior representada, por exemplo, pelos documentos WO 02/18617 A2 e WO 02/083720 A2, ensinou como transformar microorganismos que compreendem uma via do MEP nativa para a produção de terpenos, mas
5 concentrando-se na ampliação ou transformação da via nativa do MEP através da superexpressão de algumas das enzimas envolvidas ou outros métodos, tornando possível ampliar a via nativa com o objetivo de aumentar a produção de terpenos ou carotenóides.

Até onde conhecemos, portanto, nunca foi ensinado na arte anterior que um
10 microorganismo eucariótico tenha sido transformado como está presentemente reivindicado.

A presente invenção também fornece um método para acumular um terpenóide na célula e/ou meio de um microorganismo, o método que compreende a etapa de engenheirar o microorganismo para englobar uma via heteróloga para
15 produzir IPP e/ou DMAPP.

Ainda em um aspecto, a presente invenção fornece um método para produzir um terpenóide, o método que abrange a etapa de cultivar o microorganismo da invenção em um meio que leva à produção do dito terpenóide, e isolar o terpenóide a partir do meio e/ou do microorganismo.

20 A presente invenção ainda fornece um método para preparar um microorganismo capaz de acumular e/ou produzir um terpeno, o método que abrange uma etapa de transformar um microorganismo naturalmente desprovido de uma via do MEP para a produção de terpenos, com genes de uma via do MEP heteróloga e pelo menos um gene codificando uma terpeno sintase.

25 Em outro aspecto, a presente invenção fornece um método de aumentar a

quantidade de precursores de terpenóide em um microorganismo, o método que abrange uma etapa de transformar um microorganismo naturalmente desprovido de uma via do MEP para a produção de terpenos com genes de uma via do MEP heteróloga.

5 A presente invenção ainda se relaciona com um plasmídeo. Conseqüentemente, a presente invenção fornece um plasmídeo que abrange pelo menos três genes da via do MEP. A invenção fornece, além disso, um plasmídeo que engloba pelo menos três genes da via do MEP e uma terpeno sintase. Seguindo as materializações preferidas, a invenção fornece um plasmídeo composto
10 de quatro enzimas da via do MEP. Ainda em aspectos específicos da invenção, são fornecidos dois plasmídeos, um plasmídeo composto de quatro genes da via do MEP, a saber, a partir de *E. coli*, e o outro plasmídeo composto de três genes da via do MEP e uma terpeno sintase.

A invenção ainda se relaciona com os métodos de uso de tais plasmídios para
15 transformar um microorganismo eucariótico desprovido de uma via do MEP nativa. O termo "nativa" é usado aqui para se referir à via do MEP que está presente no microorganismo conforme encontrado na natureza.

Breve descrição dos desenhos

A Figura 1 apresenta a via do MEP de *E. coli* para a síntese de IPP e DMPP.
20 **1:** D-gliceraldeído 3-fosfato, **2:** piruvato, **3:** 1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato (DXP), **4:** 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP), **5:** 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol (CDP-ME), **6:** 2 fosfo-4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol (CDP-ME2P), **7:** 2-C-metil-D-eritritol 2,4 ciclodifosfato (MECDP), **8:** 1 hidróxi-2-metil-2-(E)-butenil 4-difosfato (HMBPP), **9:** isopentenil difosfato (IPP), **10:** dimetilalil difosfato (DMAPP).

25 As enzimas codificadas pelos diferentes genes são: *dxs*: DXP sintase, *dxr*.

DXP redutoisomerase, *ispD*: MEP citidililtransferase, *ispE*: CDP-ME quinase, *ispF*: MECDP sintase, *gcpE*: MECDP redutase, *lytB*: HMBPP redutase, *idi*: IPP isomerase.

A **Figura 2** mostra dois plasmídios pIP001 e pIP002, cada plasmídio composto por quatro seqüências de heterólogas de vias de terpeno. Em particular, pIP001 compreende quatro genes da via do MEP de *E. coli* (*dxs*, *dxr*, *ispD*, *ispE*) e pIP002 compreende três genes da via do MEP (*ispF*, *gcpE*, *lytB*) e uma terpeno sintase.

A **Figura 3** mostra a integração almejada de genes da via do MEP através da recombinação homóloga em *S. cerevisiae*.

Os diferentes fragmentos, isto é, os fragmentos de A a L, são ampliados através de PCR. Subseqüentemente, fragmentos específicos são fundidos juntos durante 2 PCR de fusão seqüenciais para finalmente obter fragmentos A/B/C, D/E/F, G/H/I e J/K/L. Os fragmentos A e F fornecem as regiões homólogas necessárias para integração genômica do cluster *lytB/gcpE/ispF*, enquanto os fragmentos G e L fornecem as regiões homólogas necessárias para integração genômica do cluster *dxs/dxrlispD/ispE*. Os fragmentos A/B/C e D/E/F são transformados juntos em *S. cerevisiae* para obter inserção intencionada do cluster *lytB/gcpE/ispF*. Os fragmentos G/H/I e J/K/L são transformados juntos em *S. Cerevisiae* para obter a integração almejada do cluster *dxs/dxrlispD/ispE* graças à recombinação homóloga *in vivo*.

A **Figura 4** mostra a avaliação da expressão dos genes da via do MEP.

A: amostra da cepa YIP-DV-02, B: amostra da cepa YIP-0V-02. O gene de actina é usado aqui como padrão interno.

A **Figura 5** mostra o efeito da lovastatina no crescimento de uma cepa de levedura abrigando a via do MEP e gene da valenceno sintase (YIP-DV-02) e a cepa de levedura somente com o gene da valenceno sintase como controle (YIP-0V-01).

A **Figura 6** mostra a estratégia para a deleção de *ERG13* usando o marcador seletivo *KI URA3*. O *KI URA3* flanqueado através de repetições diretas é ampliado a partir de pWJ1077 em dois fragmentos separados, mas sobrepostos, usando primers que têm adaptamers em suas extremidades. Fragmentos de aproximadamente 500
5 bp anteriores e posteriores ao local de inserção são ampliados separadamente também através de PCR usando genoma de *S. cerevisiae* como modelo. A PCR de fusão permite a combinação dos quatro fragmentos de PCR em dois. Estes últimos são transformados em *S. Cerevisiae* e a construção do *KI URA3* é integrada no locus *ERG13* graças à recombinação homóloga *in vivo*.

10 A **Figura 7** mostra três plasmídeos usados na construção de uma cepa de *S. cerevisiae* produtora de licopeno, pIP033, pIP034 e pIP035, cada plasmídeo abrigando um dos três genes *crt* otimizados por códon a partir de *E. hebricola* no pCR4TOPO.

15 A **Figura 8** mostra quatro plasmídeos usados na construção de uma cepa de *S. cerevisiae* produtora de licopeno, pIP036 (pESC-URA com *crtE*), pIP037 (pESC-HIS com *crtI*), pIP038 (pESC-HIS com *crtI* e *crtB*) e pIP039 (pESC-URA com *crtE*, *crtB*, e *crtI*), cada plasmídeo abrigando um ou mais dos três genes *crt* otimizados por códon a partir de *E. hebricola* nos vetores pESC-URA ou pESC-HIS.

Modo(s) para realizar a invenção

20 A presente invenção refere-se e faz uso de um microorganismo eucariótico que tem uma via heteróloga.

De acordo com as materializações preferidas da invenção, o microorganismo é um microorganismo fúngico, mais particularmente uma levedura.

Uma lista não exaustiva de microorganismos adequados incluirá o seguinte:
25 uma espécie pertencendo ao gênero *Saccharomyces*, por exemplo, *S. cerevisiae*, *S.*

bayanus, *S. pastorianus*, *S. paradoxus*, *S. exiguous*, *S. servazzi*, *S. uvarum*, *S. kluyveri*, *S. castellii*, uma espécie pertencendo ao gênero *Kluyveromyces*, por exemplo, *K. lactis*, *K. marxianus var. marxianus*, *K. thermotolorens*, *K. waltii*, *K. delphensis*, *K. nonfermentas*, *K. wickerhamii*, uma espécie pertencendo ao gênero

5 *Candida*, por exemplo, *C. utilis*, *C. tropicalis*, *C. castellii*, *C. humilis*, uma espécie pertencente ao gênero *Zygosaccharomyces*, por exemplo, *Z. rouxii*, *Z. bailii*, *Z. fermentati*, *Z. bisporus*, *Z. florentinus*, uma espécie pertencente ao gênero *Pichia*, por exemplo, *P. stipidis*, *P. pastoris*, *P. sorbithophila*, *P. anomala*, ou outras espécies, por exemplo, *Hansenula polymorpha*, *Yarrowia lipolytica*, *Debaromyces*

10 *hansenii*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Torulaspota delbueckii*, *Ashbya gossipie*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus nidulans*, *Penicillium chrysogenum*, *Rhizopus oryzae*, *Mucor circenelloides*.

Mais preferivelmente, o microorganismo é uma levedura e, até mais preferencialmente, o microorganismo é *Saccharomyces cerevisiae*. Por exemplo, ele

15 é a cepa de *S. cerevisiae* depositado no at DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Alemanha, número de acesso: DSMZ 17900, em 27.01.2006.

Uma via heteróloga, para o propósito da presente invenção, é uma via que, em sua atividade para formar um composto através de etapas intermediárias

20 definidas e a partir de materiais de partida definidos, não está presente no tipo selvagem do microorganismo. Mais preferivelmente, a via heteróloga é uma via derivada do DNA de uma espécie diferente.

A via heteróloga é a via do MEP (via do 2-C-Metil-D-Eritritol 4-Fosfato). Esta via, em uma materialização preferida da presente invenção, é capaz de converter 1-

25 deoxi-D-xilulose 5-fostato (DXP) em isopentenil difosfato (IPP) e/ou dimetilalil fosfato

(DMAPP). Claro, esta capacidade se refere a condições *in vivo*, onde qualquer co-fator, mineral etc., necessário para a via operar esteja presente.

De acordo com uma materialização preferida da presente invenção, a via do MEP heteróloga é capaz de converter gliceraldeído-3-fosfato (GAP) e piruvato em
5 IPP e/ou dimetilalil difosfato (DMAPP).

De acordo com uma materialização preferida, o microorganismo da invenção compreende genes heterólogos codificando pelo menos uma enzima funcional selecionada do grupo de 1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato (DXP) sintase, 1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato (DXP) redutoisomerase, 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP)
10 citidililtransferase, 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol (CDP-ME) quinase, 2-C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato (MECDP) sintase, 2-C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato (MECDP) redutase e 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil- 4-difosfato (HMBPP) redutase.

Em consideração à conveniência e simplicidade, o termo "gene", por exemplo, conforme usado na expressão "genes heterólogos", é usado para designar qualquer
15 seqüência de nucleotídeos contendo informações que codifiquem uma proteína conforme especificado. Conseqüentemente, o termo "gene" também é usado para se referir ao DNA de organismos que não sejam bactérias, tais como plantas ou animais, por exemplo, os quais geralmente contêm partes não codificantes, tais como introns ou, ainda, onde as partes não codificantes tenham sido removidas.
20 Este termo também é usado, por exemplo, para se referir ao cDNA.

Preferivelmente, o microorganismo exibe atividade enzimática de uma, algumas ou todas as enzimas citadas no parágrafo acima. Mais preferivelmente, ele exibe atividade de todas as enzimas da via do MEP.

Para o propósito da presente invenção, essas enzimas têm a capacidade de
25 catalisar as reações descritas na Figura 1. Por exemplo, a DXP sintase é uma

enzima que tem a capacidade de catalisar a formação de DXP a partir de D-gliceraldeído-3-fosfatase e piruvato.

O termo “funcional” para o propósito da presente invenção, refere-se ao fato de que a atividade da enzima pode ser observada e/ou deduzida de alguma forma.

5 Por exemplo, a funcionalidade da via do MEP heteróloga pode ser deduzida a partir da presença de IPP em um microorganismo desprovido de qualquer outra via para produzir IPP que não seja outra heteróloga.

O termo funcional também se refere ao fato de que os genes heterólogos aqui mencionados são realmente expressos pelo microorganismo.

10 Por exemplo, o microorganismo pode ter um deleção em sua via do tipo selvagem tornando a via nativa incapaz de produzir IPP. Sob estas circunstâncias, a funcionalidade da via heteróloga pode ser deduzida da capacidade do microorganismo produzir IPP e, assim, sobreviver. Por exemplo, se o microorganismo é uma cepa de *S. cerevisiae*, uma deleção pode ser construída em
15 um gene essencial da via do MEV, por exemplo, o gene ERG 13. Um cassete de deleção pode ser gerado conforme revelado na arte anterior, com primers compreendendo saliências para recombinação homóloga para deletar o gene de MEV essencial. Geralmente, comprova-se que uma cepa viável compreendendo tal deleção depende da via heteróloga.

20 Em uma materialização preferida, entretanto, o microorganismo tem uma via do MEV funcional, basicamente do tipo selvagem, e uma via do MEP funcional, basicamente heteróloga. Define-se a via do MEV como sendo uma via capaz de converter Acetil-CoA e Acetoacetil-CoA em IPP e/ou DMAPP.

Exemplos e materializações preferidas de enzimas da via do MEP são
25 aqueles com os seguintes números EC: DXP sintase: EC 2.2.1.7; DXP

redutoisomerase: EC 1.1.1.267; MEP citidililtransferase: EC 2.7.7.60; CDP-ME quinase: EC 2.7.1.148; MECDP sintase: EC 4.6.1.12; MECDP redutase: EC 1.17.4.3; e HMBPP redutase: EC 1.17.1.2.

Genes heterólogos codificando estas enzimas estão revelados em bancos de dados públicos e estão assim disponíveis para a pessoa habilitada. Exemplos de tais genes da via do MEP são os de *E. coli*. Essas amostras têm os seguintes números de acesso: *dxs*: (AAC73523, GI:1786622, U00096.2); *dxr*: (AAC73284, GI:1786369, U00096.2); *ispD*: (AAC75789, GI:1789104, U00096.2); *ispE*: (AAC74292, GI:1787459, U00096.2); *ispF*: (AAC75788, GI:1789103, U00096.2); *gcpE*: (AAC75568, GI:1788863, U00096.2); *lytB*: (AAC73140, GI:1786212, U00096.2), por exemplo.

Em uma materialização preferida, o microorganismo compreende genes heterólogos codificando um DXP-redutoisomerase funcional (*dxr*), MEP citidililtransferase (*ispD*), CDP-ME quinase (*ispE*), MECDP sintase (*ispF*), MECDP redutase (*gcpE*) e HMBPP redutase (*lytB*). Preferivelmente, o microorganismo compreende um gene heterólogo codificando uma DXP sintase (*dxs*).

Preferivelmente, o microorganismo compreende um gene heterólogo codificando uma IPP isomerase (*idi* na Figura 1).

Preferivelmente, o microorganismo compreende um gene heterólogo codificando uma FPP sintase. Genes codificando IPP isomerasas e FPP sintase têm sido descritos e estão disponíveis para a pessoa habilitada. Cópias heterólogas destes genes podem ser úteis para aumentar ainda mais a produtividade de terpeno do microorganismo da presente invenção.

Em uma materialização preferida o microorganismo compreende pelo menos um gene heterólogo codificando uma terpeno sintase funcional. Uma vantagem

importante do microorganismo da presente invenção é sua adequação para produzir qualquer terpeno à escolha da pessoa habilitada. Conseqüentemente qualquer seqüência de codificação da sintase de terpeno conhecida pode ser usada para ser heterologamente expressa no microorganismo. A particularidade da presente invenção reside no fato de que a funcionalidade da enzima da via do MEP resulta na produção heteróloga de IPP, enquanto a terpeno sintase pode ser uma enzima capaz de converter os precursores indicados abaixo em qualquer terpeno.

O termo terpeno sintase abrange enzimas, complexos e/ou grupos de enzimas capazes de sintetizar um terpeno a partir de um ou de vários precursores. Em particular, os precursores para terpenos, para o propósito da presente invenção são farnesil difosfato (FPP), geranil difosfato (GPP), geranilgeranil difosfato (GGPP), e qualquer combinação de dois ou mais destes.

Preferivelmente, uma terpeno sintase é uma única enzima, complexo e/ou grupo de enzimas capazes de sintetizar um terpeno a partir dos precursores GPP, FPP, GGPP ou uma combinação de pelo menos dois destes.

Um terpeno é um hidrocarboneto saturado ou insaturado, opcionalmente substituído, baseado ou composto essencialmente de unidades de isopreno (C5). Os terpenos podem ser acíclicos ou cíclicos. Os terpenos, conforme usado aqui, incluem terpenos, derivados de terpenos e compostos referidos como terpenóides, os quais podem ou não cair em uma das duas classes precedentes de compostos. Os derivados de terpeno incluem compostos que se submeteram a uma ou mais etapas de funcionalização, tais como hidroxilações, isomerizações, óxido-reduções ou acilações, por exemplo. Preferivelmente, para o propósito da presente invenção, um terpeno é um composto que preenche a condição acima e/ou cujo esqueleto de carbono se origina, pelo menos em parte, mas preferivelmente de modo total, da via

do MEP e/ou do MEV. Conseqüentemente, os terpenos incluem álcoois de terpeno, por exemplo, compostos de $C_{15}H_{26}O$ and $C_{10}H_{18}O$, tais como patchoulol, epicedrol, cubebol, linalol, nerolidol, por exemplo, e diálcoois, por exemplo, esclareol. Os terpenos também incluem compostos de difosfato, tais como bornil-difosfato (monoterpeno) e copalil-difosfato (diterpeno), apenas para mencionar uma pequena amostra da vasta categoria dos terpenos.

Como usado aqui, um “derivado” é qualquer composto obtido de um composto conhecido ou suposto e que contenha elementos essenciais da substância de origem.

10 Por exemplo, terpenos são compostos que têm esqueletos de carbono de C_{10} , C_{15} , C_{20} , C_{30} , C_{40} , C_{45} e assim sucessivamente.

Conseqüentemente, o termo terpeno abrange mono, sesqui, di, tri, tetra e/ou politerpenos. Em uma materialização preferida da invenção, a terpeno sintase é uma mono, sesqui e/ou diterpeno sintase. Preferivelmente, ela é uma sesquiterpeno sintase.

De acordo com uma materialização preferida, o terpeno da presente invenção é um sesquiterpeno. Por exemplo, o sesquiterpeno é cubebol, patchoulol, farneseno, amorfadieno e/ou valenceno. Os genes que codificam sintases para estes terpenos estão disponíveis nos bancos de dados públicos, por exemplo, sob os números de acesso AY508730, CQ813505, AY566286, AY523409, DQ309034, AF024615, AF374462, AF138959, AY006482, CQ813508.

As terpeno sintases e os genes que as codificam estão amplamente disponíveis para a pessoa habilitada e podem ser selecionados de acordo com as preferências. Uns poucos exemplos não limitantes são as monoterpeno sintases, por exemplo, as limoneno sintases (L13459, D49368, AAM53944), pineno sintases

(AF543530, AF543528), sabineno sintase (AF051901), bornil-difostato sintase (AF051900), 1,8-cineol sintase (AF051899) e linalool sintase (AF154124, U58314).

Os exemplos para as diterpeno sintases com seqüências disponíveis são casbeno sintase (P59287), taxadieno sintase (U48796) e abietadieno sintase (U50708). Estes
5 exemplos servem somente para ilustração da ampla aplicabilidade da presente invenção. As seqüências ainda a serem isoladas que codificam as terpeno sintases podem igualmente ser empregadas para trabalhar o princípio da presente invenção.

Preferivelmente, a terpeno sintase é heteróloga. Conseqüentemente, o terpeno não é produzido pelo microorganismo nativo e/ou do tipo selvagem.
10 Entretanto, a presente invenção também compreende ocorrências onde o microorganismo já engloba um gene nativo e/ ou tipo selvagem codificando uma sintase para produzir um terpeno. Neste caso, o microorganismo da invenção abrange cópias adicionais do mesmo gene, ou genes heterólogos codificando uma terpeno sintase capaz de produzir o mesmo terpeno ou um diferente. Desta forma,
15 quantidades maiores desse mesmo terpeno ou de uma mistura desse terpeno com outros diferentes podem ser produzidas.

De acordo com uma materialização preferida, o microorganismo da invenção fornece um rendimento de pelo menos 30 µg, mais preferivelmente ao menos 100 µg, de terpeno por grama de peso seco do microorganismo. O rendimento do
20 terpeno de um microorganismo é preferivelmente estabelecido pelo protocolo no Exemplo 10.

Preferivelmente, os genes heterólogos estão sob controle dos promotores. Preferivelmente, estes promotores estão na vizinhança próxima dos genes heterólogos. Até mais preferivelmente, cada um dos genes heterólogos, isto é,
25 aqueles da via do MEP e o gene da terpeno sintase estão individualmente sob

controle de um promotor localizado anteriormente à respectiva seqüência de codificação. Qualquer promotor pode ser usado, por exemplo, promotores constitutivos fortes e/ou fracos ou promotores indutivos. Exemplos de promotores preferidos são os promotores de *S. cerevisiae* indutíveis por galactose, tais como GAL1 e GAL10 ou promotores de *S.cerevisiae* constitutivos fortes, tais como TPI1 e TEF1.

Preferivelmente, cada um dos genes heterólogos mencionados acima está associado com uma seqüência de terminador. Preferivelmente, a seqüência de terminador está localizada posteriormente ao gene heterólogo. Assim como para as seqüências de promotor, as seqüências de terminador podem ser selecionadas a partir de um vasto "pool" de seqüências de terminador conhecidas ou ainda a serem descritas. Exemplos são os terminadores de *S.cerevisiae* de CYC1, ADH1, TPI1 ou FBP1.

O microorganismo pode ou não compreender genes heterólogos adicionais. Tipicamente, os genes heterólogos adicionais incluem seqüências de marcadores, tais como marcadores de resistência ou auxotróficos, indicando que um gene heterólogo de escolha está presente em um microorganismo selecionado.

Um problema subjacente à presente invenção é a estabilização de uma grande quantidade de material genético heterólogo durante gerações sucessivas do microorganismo. Grandes plasmídeos são difíceis de construir e não são facilmente absorvidos e mantidos pelo microorganismo. Além do mais, manter plasmídios pode constituir um custo energético para a célula, e isto pode abaixar as capacidades de produção. Se muitos plasmídeos pequenos forem usados, entretanto, alguns deles podem ser perdidos com cada ciclo de replicação. Além do mais, regiões homólogas em diferentes plasmídeos, ou dentro do mesmo plasmídeo, podem recombinar,

resultando na perda do material genético heterólogo.

Notadamente, os presentes inventores poderiam transformar um microorganismo introduzindo estavelmente uma via heteróloga. Os genes da via heteróloga podem estar presentes em plasmídeos do microorganismo.

5 Conseqüentemente, a presente invenção fornece um plasmídeo e/ou um par de plasmídeos conforme aqui definido com respeito ao microorganismo. Esses plasmídeos são surpreendentemente adequados para transformar um microorganismo com uma via do MEP heteróloga. Preferivelmente, o microorganismo abrange pelo menos dois plasmídeos com genes da via heteróloga
10 e, opcionalmente, um gene codificando uma terpeno sintase. Mais preferivelmente, ele compreende dois (2) plasmídeos.

Em uma materialização preferida, o microorganismo compreende pelo menos dois plasmídeos, um plasmídeo compreendendo pelo menos três (3) e o outro plasmídeo compreendendo outros três (3) genes da via heteróloga. Preferivelmente,
15 todos os genes são diferentes genes que têm diferentes atividades enzimáticas.

Conseqüentemente, a presente invenção fornece um plasmídeo compreendendo 3 genes da via heteróloga, opcionalmente compreendendo ainda pelo menos um gene heterólogo que codifica uma DXP sintase funcional. Mais preferivelmente, o plasmídeo compreende 4 genes da via MEP.

20 A presente invenção ainda fornece um plasmídeo que compreende 3 genes da via heteróloga e ainda compreendendo pelo menos um gene heterólogo que codifica uma terpeno síntase funcional.

Conseqüentemente, o microorganismo preferivelmente compreende dois plasmídeos, um abrangendo (4) diferentes genes da via heteróloga, incluindo um
25 gene que codifica uma DXP sintase, e o outro plasmídeo compreende três (3) genes

da via do MEP e um gene que codifica uma terpeno sintase.

Em uma materialização preferida da invenção, o microorganismo compreende pelo menos (2) plasmídeos que, absorvidos juntos, compreendem os genes *dxs*, *dxr*, *ispD*, *ispE*, *ispF*, *gcpE*, *lytB* e um gene que codifica uma terpeno sintase. Em outras
5 palavras, pelo menos dois plasmídeos, por exemplo, 3 ou 4 plasmídeos, compreendem esses genes de modo que cada gene esteja presente em pelo menos um dos dois plasmídeos.

Qualquer vetor e/ou plasmídeo adequado pode ser usado para abrigar os genes heterólogos. Exemplos de plasmídeos adequados para transformar o
10 microorganismo são vetores pESC (por exemplo, pESC-URA, Stratagene), vetores pYES (por exemplo, pYES2/CT, Invitrogen), e vetores pRS (por exemplo, pRS426, Sikorski e Hieter, 1989, Genetics 122:19).

De acordo com uma materialização preferida, alternativa, os genes que codificam a via heteróloga são integrados no genoma do microorganismo.

15 Esta materialização tem várias vantagens quando comparada com a materialização onde os genes da via heteróloga estão localizados nos plasmídeos. Primeiramente, a integração no genoma aumenta a estabilidade da integração dos genes heterólogos durante as gerações sucessivas. Além disso, os procedimentos subseqüentes de otimização, tais como engenharia evolucionária, são muito mais
20 fáceis de realizar. Então, este sistema é mais flexível com respeito à localização do gene que codifica a terpeno sintase. Este último pode, então, estar presente em um plasmídeo comparativamente pequeno e/ou também integrado no genoma. Vantagens básicas da integração no genoma são, desta forma, a estabilidade e, em menor extensão, a flexibilidade.

25 Conseqüentemente, em uma materialização preferida, os genes da via

heteróloga e/ou o gene da DXS sintase estão integrados no genoma do microorganismo, e um gene que codifica terpeno sintase está presente em um plasmídeo e/ou integrado no genome. Preferivelmente, o gene que codifica uma terpeno sintase está presente em um plasmídeo, uma vez que isto facilita a
5 transformação adicional do microorganismo com uma variedade de sintases.

Alternativamente, o gene heterólogo da terpeno sintase pode ser inserido no genoma do microorganismo, e os genes da via do MEP heteróloga e/ou o gene da DXP sintase estar presente em plasmídeos conforme revelado acima, por exemplo.

Variações adicionais possíveis em relação à repartição dos genes heterólogos
10 no genoma e/ou nos plasmídeos serão apreciadas pela pessoa habilitada e não são discutidos em todos os detalhes.

O genoma do microorganismo, para o propósito da presente invenção, é equivalente à totalidade do DNA cromossômico, mas exclui o DNA dos plasmídeos e o DNA mitocondrial.

15 Todos os DNA heterólogos podem ser otimizados pelo códon. Conseqüentemente, os códons de DNA heterólogo são preferivelmente modificados para corresponder aos códons preferidos do microorganismo. Os códons também podem ser modificados para minimizar o teor de GC no DNA heterólogo e alterar a formação da estrutura secundária do mRNA. Isto permite obter níveis mais altos de
20 enzimas da via do MEP e/ou terpeno sintase, heterologamente expressas no microorganismo.

O Ergosterol é um composto essencial para o crescimento de determinados microorganismos, tais como fungos, e, em particular, levedura. Entretanto, de modo a atrair o fluxo de carbono em direção à produção do terpeno de escolha de acordo
25 com a invenção, a produção de ergosterol no microorganismo da invenção é

preferivelmente reduzida. Isto é preferivelmente conseguido substituindo os promotores da biossíntese do ergosterol com somente promotores fracamente constitutivos e/ou repressíveis. Preferivelmente, o promotor nativo do gene codificador da esqualeno sintase ERG9 em levedura é substituído por um promotor
5 fracamente constitutivo ou repressível. Por exemplo, na levedura, o promotor nativo pode ser substituído pelo promotor de MET3 de *S. cerevisiae*. Os promotores podem ser substituídos pela PCR de fusão e pelo método que almeja o gene bipartido (Ederniz *et al.*, 1997, *Genome Research* 7: 1174).

Se o microorganismo é um fungo e, preferivelmente uma cepa de
10 *Saccharomyces*, fosfatases que hidrolisam intermediários importantes para acumulação de terpenos como FPP e/ou GGPP, são preferivelmente de maneira total ou parcialmente inativados. Em *S. cerevisiae*, demonstrou-se que os produtos dos genes LPP1 (YDR284C) e DPP1 (YDR284C) têm tal atividade (Faulkner *et al.*, 1999, *J. Biol. Chem.* 274: 14831). Estes ou genes similares são, assim,
15 preferivelmente deletados se presentes no microorganismo da presente invenção.

A presente invenção fornece métodos para acumular um terpeno na célula e/ou meio de um microorganismo, para produzir um terpeno e para aumentar a quantidade de precursores de terpeno em um microorganismo.

Os terpenos podem acumular-se nas células. Por exemplo, eles podem
20 acumular-se no citoplasma, nas mitocôndrias, membranas celulares ou outras organelas celulares. Muitos terpenos são compostos lipofílicos, os quais se acumulam na membrana plasmática da célula.

Para o propósito da presente invenção, o termo “acumulando no meio” também engloba a acumulação em um solvente durante um processo de
25 fermentação de duas fases.

O terpeno e o microorganismo usados em tais métodos são conforme definido acima. O meio do microorganismo pode ser líquido ou sólido a 25°C (temperatura ambiente), mais é preferivelmente líquido.

O meio é selecionado em função das necessidades do microorganismo selecionado. O meio, assim, contém todos os ingredientes e fatores necessários para crescimento e/ou produção do terpeno. Frequentemente, um meio é selecionado para o crescimento do microorganismo diferente daquele para produção do terpeno. O último é normalmente obtido trazendo o microorganismo para um estágio em seu ciclo de vida onde a replicação é minimizada e a transcrição e/ou síntese de proteína maximizada. O meio geralmente precisa conter todos os fatores necessários para a sobrevivência ao menos de curto prazo da cepa.

De acordo com uma materialização preferida, a etapa de cultivar o microorganismo e/ou a etapa de isolar o terpeno a partir do meio é realizada via uma fermentação de duas fases.

Conseqüentemente, solventes orgânicos imiscíveis e biocompatíveis são adicionados a um meio de cultura.

Esses solventes formam uma segunda fase, preferivelmente hidrófoba, capaz de acumular o terpeno e/ou evitar sua perda por evaporação ou outros fenômenos. Desta forma, os solventes orgânicos podem ser usados para separação *in-situ* de metabólitos na fermentação (Frenz et al., 1989, Enzyme Microb. Technol. 11:717; Sim et al., 2001, Biotechnol. Lett. 23:201). Uma fermentação de duas fases, para o propósito da presente invenção, é um método de cultivar um microorganismo caracterizado pela presença de pelo menos um solvente orgânico no, ou além do meio do microorganismo, para formar pelo menos um sistema de duas fases.

Preferivelmente, o solvente orgânico, não afeta significativamente o

crescimento e/ou sobrevivência do microorganismo. Solventes adequados para fermentações de duas fases são diisononil ftalato, dibutil ftalato, álcool oleílico, dihexil-éter e dodecano, por exemplo.

A fermentação de duas fases também inclui uma separação ao menos parcial
5 e/ou isolamento do terpeno do meio.

O método para acumular um terpeno compreende a etapa de engenheirar o microorganismo para abranger a via do MEP heteróloga para produzir IPP e/ou DMAPP. A engenharia pode ser realizada com base no material descrito acima. Conseqüentemente, a engenharia pode ser através da transformação com
10 plasmídeos e/ou através da integração genômica do material genético heterólogo. Os procedimentos para engenharia genética são conhecidos para a pessoa habilitada e nenhuma limitação com respeito a qualquer metodologia particular é necessária.

De acordo com uma materialização preferida, o método compreende uma
15 etapa de engenheirar o microorganismo para compreender uma terpeno sintase heteróloga. Preferivelmente, uma etapa de engenharia é realizada transformando o microorganismo para compreender plasmídeos contendo genes que codificam enzimas da via heteróloga.

Em uma materialização adicional, o método compreende a etapa de cultivar o
20 microorganismo sob condições que levam à produção do dito terpeno. Essas condições são conhecidas para a pessoa habilitada. Geralmente, elas podem ser ajustadas através da seleção de um meio adequado, vaso de fermentação, temperatura e pH.

O método para produzir um terpeno pode compreender a etapa de isolar o
25 terpeno a partir do meio, a partir das células e/ou de um solvente orgânico, no caso

de uma fermentação de duas fases ser realizada. O terpeno pode ser isolado através de qualquer método usado na arte, incluindo, mas não limitado a cromatografia, extração e destilação, por exemplo.

Os microorganismos e métodos de acordo com a invenção fornecem, assim, 5 uma plataforma melhorada e flexível para a produção de uma variedade de terpenos individuais, ou misturas destes; e essa plataforma ainda pode ser complementada via uma possível transformação adicional dos microorganismos via integração ou ampliação de outras enzimas capazes de converterem os terpenos em outros compostos úteis na indústria de flavorizantes e fragrâncias em particular. Um uso 10 óbvio é para a conversão dos terpenos apropriados em carotenóides, via integração das enzimas apropriadas, nos microorganismos da invenção, via plasmídeo ou incorporação do genoma. Outro é a conversão de valenceno em nootkatona, por exemplo, através da inserção adicional, no metabolismo do microorganismo, de citocromo P450 monooxigenase capaz de efetuar essa conversão. A invenção, 15 assim, fornece uma ferramenta útil e vantajosa para a produção de terpenos e seus derivados, bem como dos precursores.

Exemplos

Pretende-se que os seguintes exemplos ilustrem a invenção sem limitar o escopo como resultado. As porcentagens são dadas com base no peso a menos 20 que indicado de outra forma.

Exemplos 1-4

Os genes *dxs*, *dxr*, *ispD*, *ispE*, *ispF*, *gcpE* e os genes *lytB* foram ampliados a partir do DNA genômico de *E. coli* atv de PCR usando os primers listados na Tabela 1.

25 Genes que codificam terpene sintases, em particular, genes que codificam

patchoulol sintase (PatTps177, acesso GeneBank No. AY508730), cubebol sintase (GFTpsC, acesso GenBank No. CQ813505) e valenceno sintase (GFTpsD, acesso GenBank No. CQ813508) foram ampliados a partir de plasmídeo pET11a ou pET101 contendo esses genes e usando os primers listados na Tabela 4. As seqüências dessas terpeno sintases, bem como o isolamento dos respectivos genes, e a construção dos plasmídeos citados estão divulgados nos WO05/052163, WO05/056803 (patchoulol sintase) e WO04/031376 (valenceno e cubebol sintase).

As condições de PCR estavam de acordo com as condições padrão de "Expand High Fidelity" (Roche Applied Science). Os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese com gel e os fragmentos do tamanho esperado, depois purificados usando o Kit de Purificação de Produto de PCR Altamente Puro (Roche Applied Science).

Exemplos 1-4, parte (a)

Os produtos de PCR purificados do *dxr*, *ispD*, *ispF*, *lytB*, gene de valenceno sintase e gene de cubebol sintase e um plasmídeo (pESC-TRP ou pESC-URA) foram digeridos com as enzimas de restrição indicadas na Tabela 1 ou 4 e purificados com o kit de extração por Gel QIAEX[®] II (Qiagen). Para os genes de terpeno sintase, pESC-TRP foi usado, caso contrário ver Tabela 1. A ligação *in vitro* do plasmídeo digerido com o produto de PCR digerido foi realizada como o procedimento padrão dado para a T4 DNA ligase (Roche Applied Science) com uma razão inserto/vetor de pelo menos 3:1 e incubada a 4°C por 16 horas. A mescla de ligação resultante foi usada para transformar quimicamente as células competentes de *E. coli* (DH5 α) (Inoue *et al*, 1990, *Gene* 96:23) e os transformadores foram selecionados no meio LB suplementado com ampicilina (1% Triptona, 0,5% extrato de levedura, 1% NaCl, 2% agar, pH 7, 75 mg/L ampicilina).

Os transformadores foram depois verificados purificando os plasmídeos e realizando a digestão com enzimas de restrição adequadas. Se um transformador contivesse um plasmídeo do tamanho correto, 1 µg do plasmídeo DNA era purificado e enviado para seqüenciamento.

5 Os plasmídeos obtidos são conforme segue:

dxr em pESC-TRP: pIP020; *ispD* em pESC-URA: pIP018; *ispF* em pESC-TRP: pIP016; *lytB* em pESC-URA: pIP009; Valenceno sintase em pESC-TRP: pIP027; Cubebol sintase em pESC-TRP: pIP013.

Tabela 1 Primers de PCR usados para clonar genes da via de *E. coli*

Genes	Primers	Seqüência	Técnica de clonagem	Plasmídeo original
<i>dxr</i>	<i>dxrM1A</i>	ggactagtctaatgaagcaactcaccatt c	SpeI	pESC-TRP
	<i>dxrM1B</i>	ccatcgatggTCAGCTTGCGAGA CGCATC	Clal	
<i>dxs</i>	<i>dxsGAPs</i>	ACTTTAACGTCAAGGAGAAAA AACCCCGGATCCCatgagttttgat attgcc	reparo de GAP	
	<i>dxsGAPr</i>	TTCTTCGGAAATCAACTTCTG TTCCATGTCGACGCCTTATGC CAGCCAGGCCTTG	reparo de GAP	
<i>ispD</i>	<i>ispDM1A</i>	GGACTAGTCCTAatggcaaccact catttgg	SpeI	pESC-URA

	ispDM1B	CCATCGATGGTTATGTATTCT CCTGATGG	Clal	
ispE	ispEGAPs	ACTTTAACGTCAAGGAGAAAA AACCCCGGATCCCatgcgacac agtggccctc	reparo de GAP	
	ispEGAPr	TTCGGAAATCAACTTCTGTTC CATGTGACGCCTTAAAGCAT GGCTCTGTGCAATGG	reparo de GAP	
ispF	ispFM1A	ggactagtccaatgccaattggacacgg	SpeI	pESC-TRP
	ispFM1B	ccatcgatggTCATTTTGTTCCT TAATG	Clal	
gcpE	gcpEM1A	GGACTAGTCCTAatgcataaccag gctccaattc	SpeI	pESC- URA +lytB
	gcpEM1B	CGAGCTCGTTATTTTCAACC TGCTGAACG	Clal	
lytB	lytBM1A	GCGTCGACGTCTTGatgcagatc ctgttgccaacc	Sall	pESC- URA
	lytBM1B	CCCTCGAGGGTTTAATCGACT TCACGAATATCG	XhoI	
"Fusão"	pfus_grf	CAGCACTACCCTTTAGCTGTT CTATATGCTGCCACTCCTacgc aaaccgcctctccccg	reparo de GAP	
	Pfus_grr	AGGAAATGATAGCATTGAAG GATGAGACTAATCCAATTAatcg gtgcgggcctcttcgc	reparo de GAP	

A “técnica de clonagem” envolve digestão dos modelos pelas enzimas de restrição citadas seguidas pela ligação e transformação dos produtos resultantes em *E. coli*, ou construção *in vivo* graças ao reparo de GAP em *S. cerevisiae*.

Exemplos 1-4, parte (b)

Os genes remanescentes, *dxs*, *ispE*, *gcpE* e uma terpeno sintase selecionada onde inserido cada um em um dos plasmídeos previamente mencionados (pIP020, 018, 009) através da clonagem clássica ou do método de reparo de gap conforme segue.

Os *gcpE*, produtos de PCR de valenceno sintase e cubebol sintase foram clonados seguindo o esquema abaixo:

Tabela 2

Produto de PCR	Plasmídeo de clonagem	Plasmídeo resultante
<i>gcpE</i>	pIP009 (<i>lytB</i> em pESC-URA)	pIP008
Valenceno sint.	pIP016 (<i>ispF</i> em pESC-TRP)	pIP015
Cubebol sint.	pIP016 (<i>ispF</i> em pESC-TRP)	pIP014

Os produtos de PCR e plasmídeos foram digeridos com as enzimas de restrição indicadas na Tabela 1 ou Tabela 4, respectivamente, purificados, ligados *in vitro*, seguidos por transformação de *E. coli*, seleção de transformadores e verificação de transformadores através do seqüenciamento dos plasmídeos esperados exatamente como indicado para os Exemplos 1-4(a) acima.

O método de reparo de gap foi usado para clonar *dxs* em pIP020, *ispE* em pIP018 e uma patchoulol sintase em pIP016 para obter plasmídeos cada um compreendendo dois genes adicionais.

Este método de clonagem utiliza recombinação homóloga em levedura para juntar seqüências de DNA homólogas (DeMarini *et al*, 2001, BioTechniques 30:520-

52). Esta técnica consiste em gerar produtos de PCR com as extremidades homólogas para o local de inserção no plasmídeo a construir. Os primers utilizados para clonar *dxs* e *ispE* são dados na Tabela 1, aqueles para clonar uma terpeno sintase na Tabela 4.

5 Os produtos de PCR (*dxs*, *ispE*, terpeno sintase) e plasmídeos alvo foram digeridos de acordo com o esquema a seguir:

Tabela 3

Produto de PCR	Plasmídeo de clonagem	Enzimas de Restr.	Plasmídeo resultante
<i>dxs</i>	PIP020	BamHI e Sall	pIP019
<i>ispE</i>	PIP018	Sall	pIP017
Sint.Patchoulol.	pIP016	Xmal	PIP012

O produto de PCR e o plasmídeo digeridos foram ambos transformados em *S. cerevisiae* YIP-00-02 (MATa *trp1 ura3*) usando procedimento padrão de
 10 transformação (Gietz e Woods, 2002, Methods in Enzymology 350: 87). Os transformadores foram selecionados em meio SC-*trp* (6,7 g/L base de nitrogênio para levedura sem aminoácidos, 2 g/L menos mescla de retirada de *trp*, 2% glicose, 2% agar) ou meio SC-*ura* (6,7 g/L base de nitrogênio para levedura sem aminoácidos, 2 g/L menos mescla de retirada de *ura*, 2% glicose, 2% agar). Após 2-
 15 3 dias de incubação a 30°C, todos os transformadores foram inoculados em um único tubo de ensaio contendo 5 mL of SC-*trp* (6,7 g/L base de nitrogênio para levedura sem aminoácidos, 2 g/L menos mescla de retirada de *trp*, 2% glicose) ou SC-*ura* (6,7 g/L base de nitrogênio para levedura sem aminoácidos, 2 g/L menos mescla de retirada de *ura*, 2% glicose) e incubados 12 h a 30°C. A partir deste
 20 cultivo, o DNA total foi isolado (Sambrook e Russell, 2000, Molecular cloning a

laboratory manual 3rd ed. 6.31-6.32) e utilizado depois para transformar quimicamente as células competentes de *E. coli* (DH5α) (Inoue *et al*, 1990). Os transformadores foram selecionados em placas contendo meio LB suplementado com ampicilina.

5 Tabela 4

Genes	Primers	Seqüência	Técnica de clonagem
Cúbebol s.	GFTpsCM 2A	CGGGATCCCGTGGGCCCTatggcacttc aagattcaga	BamHI
	GFTpsCM 2B	AAGACGTGCGACGCTTCAAAGGGAA CAGGCTTCT	Sall
Valenceno s.	GFTpsD6 M2A	cgggatcccgtgggccctatgtcgtctggagaaacatt	BamHI
	GFTpsD6 M2B	aagacgtcgacgctTCAAATGGAACGTG GTCTC	Sall
Patchoulol s.	Ps_GAP_f	ACTTTAACGTCAAGGAGAAAAACCC CGGATCCAATGGAGTTGTATGCCCA AAGTGTTG	Reparo de Gap
	Ps_GAP_r	TTCTTCGGAAATCAACTTCTGTTCCA TGTCGACGCCTTAATATGGAACAGG GTGAAGGTACAAC	Reparo de Gap

A “técnica de clonagem” envolve digestão dos modelos através das enzimas de restrição citadas, seguidas pela ligação e transformação dos produtos resultantes em *E. coli*, ou construção in vivo graças ao reparo de GAP em *S. cerevisiae*.

Exemplo 5: combinação de plasmídeo através de recombinação homóloga *in vivo* em *Saccharomyces cerevisiae* (Reparo de gap)

Para reduzir a instabilidade do plasmídeo e facilitar a integração posterior dos genes no genoma de *Saccharomyces cerevisiae*, os 4 plasmídeos foram combinados entre si, dois a dois, para terminar com 2 plasmídeos principais: um suportando *dxs*, *dxr*, *ispD*, *ispE* (pIP001) e o outro suportando *gcpE*, *lytB*, *ispF* e um gene de sesquiterpeno sintase (no caso da valenceno sintase, esse plasmídeo é denominado pIP002). A combinação dos diferentes plasmídeos foi realizada através de reparo de gap em *S. cerevisiae* (DeMarini *et. al*, 2001, BioTechniques 30:520-52).

Para construir o plasmídeo pIP002, o pedaço de DNA contendo *ispF*, gene que codifica valenceno sintase, promotores de *GAL1* e *GAL10*, terminadores *CYC1* e *ADH1* (pIP015) foi ampliada através de PCR usando os primers *pfus_grf* e *pfus_grr* (Tabela 1). Os produtos de PCR resultantes foram purificados usando o Kit de Purificação de Produto de PCR Altamente Puro (Roche Applied Science). O plasmídeo pIP008 (pESC-URA contendo *gcpE* e *lytB*) foi digerido por *MfeI*, e subseqüentemente purificado após eletroforese com gel usando Kit de Extração por Gel QIAEX[®] II (Qiagen). O plasmídeo purificado e digerido junto com os produtos de PCR foram usados na transformação de *S. cerevisiae* YIP-00-03 (MATa *ura3*) (Gietz e Woods, 2002). Os transformadores foram selecionados em placas contendo meio SC-ura. Após 2-3 dias de incubação a 30°C, todos os transformadores foram inoculados em um único tubo de ensaio contendo 5 mL de SC-ura e incubados 12 h a 30°C. A partir deste cultivo, o DNA total foi isolado (Sambrook e Russell, 2000) e utilizado depois para transformar quimicamente as células competentes de *E. coli* (DH5 α) (Inoue *et al*, 1990). Os transformadores foram selecionados em placas contendo meio LB suplementado com ampicilina. Os transformadores foram, então,

verificados purificando os plasmídeos e realizando digestão enzimática com enzimas de restrição adequadas. No caso de transformadores contendo o plasmídeo esperado, 1 µg de DNA de plasmídeo era purificado e enviado para seqüenciamento. O plasmídeo resultante pESC-URA contendo *gcpE*, *lytB*, *ispF* e valenceno sintase foi denominado pIP002 (Fig. 2).

O mesmo protocolo foi seguido para construir o plasmídeo pIP001, i.é, o pedaço de DNA contendo promotores de *ispD*, *ispE*, *GAL1* e *GAL10*, terminadores de *CYC1* e *ADH1* foi ampliado através de PCR usando os primers *pfus_grf* e *pfus_grr* (Tabela 1). The produtos de PCR resultantes foram purificados usando o Kit de Purificação de Produto de PCR Altamente Puro (Roche Applied Science). O plasmídeo pESC-TRP contendo *dxs* e *dxr* foi digerido por *XcmI*, e subseqüentemente purificados após eletroforese com gel usando QIAEX[®] II Gel Extração Kit (Qiagen). O plasmídeo purificado e digerido junto com os produtos de PCR foram usados na transformação de *S. cerevisiae* YIP-00-02 (MATa *trp1 ura3*) (Gietz e Woods, 2002). Os transformadores foram selecionados em placas contendo meio SC-*trp*. Após 2-3 dias de incubação a 30°C, todos os transformadores foram inoculados em um único tubo de ensaio contendo 5 mL de SC-*trp* e incubados 12 h a 30°C. A partir deste cultivo, o DNA total foi isolado (Sambrook e Russell, 2000) e utilizado depois para transformar quimicamente as células competentes de *E. coli* (DH5α) (Inoue *et al*, 1990). Os transformadores foram selecionados em placas contendo meio LB suplementado com ampicilina. Os transformadores foram, então, verificados purificando os plasmídeos e realizando digestão enzimática com enzimas de restrição adequadas. No caso de transformadores contendo o plasmídeo esperado, 1 µg de DNA de plasmídeo era purificado e enviado para seqüenciamento. O plasmídeo resultante pESC-TRP contendo *dxs*, *dxr*, *ispD* e *ispE*

foi denominado pIP001 (Fig. 2).

O protocolo acima para produzir plasmídeo pIP002 foi repetido substituindo pIP015 por pIP014 e pIP012, para obter os plasmídeos pIP003 e pIP005 compreendendo os genes de cubebol e patchoulol sintase, respectivamente.

5 **Exemplo 6: Construção de uma cepa de *S. cerevisiae* expressando a via do MEP a partir de plasmídeos para a produção de isoprenóides**

Os plasmídeos purificados pIP001 e pIP002 (Fig. 2) foram sucessivamente transformados (Gietz e Woods, 2002) na cepa *S. cerevisiae* YIP-00-02 (MATa *trp1 ura3*). Após a transformação com pIP001, os transformadores foram selecionados
10 em placas contendo meio SC-trp. Um transformador foi colônia-purificado e transformado com pIP002. Os transformadores foram selecionados em placas contendo meio SC-trp-ura (6,7 g/L base de nitrogênio para levedura sem aminocácidos, 2 g/L menos trp menos mescla de retirada de ura, 2% glicose, 2% agar). Inúmeros transformadores foram inoculados em uma série de tubos de ensaio
15 independentes contendo 5 mL de SC-trp-ura e incubados 12 h a 30°C. A partir destes cultivos, o DNA total era isolado de cada transformador (Sambrook e Russell, 2000). A presença de genes da via do MEP foi verificada através de PCR. Três clones caracterizados pela presença dos genes da via do MEP e do gene de valenceno sintase foram selecionados para caracterização posterior e denominados
20 YIP-DV-01, YIP-DV-02 e YIP-DV-03. O YIP-DV-02 foi depositado no DSMZ sob o número de depósito DSM 17900. Cada gene codificando cada uma das 7 enzimas da via do MEP era ampliado através de PCR a partir da cepa YIP-DV-02 e enviado para seqüenciamento (MWG-Biotech AG DNA Sequencing Service). As seqüências resultantes foram comparadas com as seqüências originais dos genes da via do
25 MEP de *E. coli* depositados na Genbank® para verificar a ausência de mutações.

A construção de cepas de *S. cerevisiae* expressando a via do MEP junto com os genes que codificam cubebol sintase ou patchoulol sintase foi realizada conforme descrito para a construção das cepas de *S. cerevisiae* YIP-DV-01, YIP-DV-02 e YIP-DV-03. Para construir plasmídeos contendo *gcpE*, *lytB*, *ispF* e uma sesquiterpeno sintase, o mesmo procedimento do Exemplo 5 foi seguido, mas substituindo a valenceno sintase por uma sesquiterpeno sintase apropriada citada acima. Essas cepas, todas expressando a via do MEP e expressando cubebol sintase ou patchoulol sintase, são denominadas, respectivamente, YIP-DC-01 e YIP-DP-01.

Exemplo 7: Integração dos genes da via do MEP no genoma de

10 *Saccharomyces cerevisiae*

A fim de estabilizar a expressão dos genes da via do MEP, os cassetes dos 7 genes foram integrados no genoma de *Saccharomyces cerevisiae*. Isto é feito usando recombinação homóloga *in vivo* em *Saccharomyces cerevisiae* (DeMarini *et al*, 2001) e o método almejando o gene bipartido (Ederniz *et al*, 1997, Genome Research 7: 1174). A integração dos 2 clusters de gene é feita em 2 loci específicos. A estratégia para integração é conforme segue (Fig. 3). Para cada cluster de gene (*dxs/dxr ispD/ispE* ou *gcpE/lytB ispF*), 6 produtos de PCR são gerados primeiro (Fig. 3) a partir do plasmídeo pIP001 ou pIP002. Esses produtos de PCR são depois fundidos juntos durante 2 PCR de fusão subsequentes. Por exemplo, os fragmentos A, B e C são ampliados primeiro separadamente. Depois, eles são fundidos durante 2 PCR de fusão, resultando um fragmento A/B/C linear longo (Fig. 3) Os fragmentos de PCR fundidos resultantes são caracterizados por regiões de superposição no nível do marcador seletivo (*Kluyveromyces lactis URA3* ou *KanMX*) e pelas extremidades compartilhando homologia com os 2 locais de integração diferentes no genoma (Fig. 3). Os locais de integração são o locus *ura3* para o primeiro cluster e

pDC6 (que codifica uma isozima de piruvato descarboxilase de atividade de importância secundária) ou uma região não-codificadora de genoma para o segundo genoma. Essas características são essenciais para a inserção almejada dos 2 clusters de gene no genoma de *S. cerevisiae*. A PCR é realizada de acordo com as condições padrão Expand High Fidelity (Roche Applied Science). Os produtos de PCR são purificados usando o Kit de Purificação de Produto de PCR Altamente Puro (Roche Applied Science) após cada PCR e etapa de PCR de fusão. Os últimos fragmentos são usados para a transformação de *S. cerevisiae* YIP-00-03 (MATa *ura3*) através de um protocolo padrão (Gietz e Woods, 2002). Os transformadores são selecionados em placas contendo meio SC-ura para a inserção do cluster *lytB/gcpE-KI URA3-ispF* e em placas contendo meio SC-ura suplementado com geneticina para a inserção de ambos os clusters. Após 2-3 dias de incubação a 30°C, colônias simples são cultivadas durante a noite em 5 mL de meio SC-ura + geneticina (6,7 g/L base de nitrogênio para levedura sem aminoácidos, 2 g.L⁻¹ menos mescla de retirada de ura, 2% glicose, 200 mg.L⁻¹ geneticina, 2% agar). A partir deste cultivo, o DNA total é isolado (Sambrook e Russell, 2000). A integração dos clusters de gene em loci específicos é verificada através de PCR. Uma das cepas resultantes selecionadas é a YIP-D0-01.

Exemplo 8 : Avaliação da expressão dos genes da via do MEP de *E. coli* em *S. cerevisiae*.

A fim de verificar a expressão de todos os 7 genes da via do MEP de *E. coli* em *S. cerevisiae*, seus perfis de expressão foram avaliados através de uma fermentação usando RT-PCR (PCR de Transcrição Reversa). Para detectar especificamente a expressão de cada gene da via do MEP, um conjunto de primers específicos foi desenhado para cada um deles (Tabela 5), e as condições de PCR

otimizadas.

Ao cultivar as cepas YIP-DV-02 e YIP-0V-02 em frascos com agitação, usando galactose como fonte de carbono (20 g.L⁻¹), mantendo a temperatura de cultivo em 30°C e agitando a 150 rpm, amostras foram tomadas em diferentes fases de crescimento e o RNA total extraído de acordo com o kit FastRNA[®] Pro Red (Qbiogene). Para remover qualquer traço de DNA contaminante, um tratamento subseqüente das amostras de RNA com Turbo DNase[™] (Ambion) era aplicado seguindo as condições padrão descritas para o kit sem Turbo DNase[™] (Ambion, Foster City, CA). O RNA era, então, armazenado a -80°C. Após verificar a concentração e integridade das amostras de RNA, a RT-PCR era realizada conforme segue. A transcrição reversa para síntese do primeiro DNA de fita simples foi realizada de acordo com as condições padrão de Expand Reverse Transcriptase (Roche) usando primers específicos para cada gene da via do MEP (Tabela 6). A reação era interrompida colocando os tubos em gelo. Depois, uma reação de PCR era realizada usando a Taq DNA polimerase e os primers específicos para cada gene. As temperaturas de têmpera eram 55°C para *dxs*, *ispD*, *ispE*, *ispF* e *lytB*, 57°C para *dxr* e *gcpE* e 53°C para actina (usada como padrão interno). O tempo de alongamento era de 90 segundos e a ampliação era realizada durante 35 ciclos. Para confirmar que o fragmento de DNA observado foi ampliado a partir do mRNA e não a partir do DNA de plasmídeo, uma PCR de controle era realizada nas mesmas condições da RT-PCR, mas sem a etapa de transcrição reversa. Essa PCR de controle não revelou nenhuma ou revelou quantidades de importância secundária de ampliação contaminante a partir do DNA que não afetavam o experimento de RT-PCR.

Tabela 5 - Primers usados para avaliar a expressão dos genes da via do

MEP através de RT-PCR.

Genes	Primers	Seqüência	Tamanho	T _m
			excluído (bp)	(°C)
dxr	Dxr_f_new	CAGTGATTCACCTCAATGGTG	424	58
	Dxr_r_new	ACGCATCACCTCTTTTCTGGCG		60
lytB	lytB_f	CTGGCAGAACAGGCGGAAGTTG	299	61
	lytB_r	ACGCAGCTCTTTCGGCACTTC		58
ispF	ispF_f	GCTCCATGCGTTGACCGATG	302	64
	ispF_r	CCGGTAAATCCCAGTTTTTCCG		58
ispE	ispE_f	TAAAGATCCTGAACTCCCGCGC	291	59
	ispE_r	CATGGCTCTGTGCAATGGGG		64
ispD	ispD_f	CGCACCAGTGCGCGATACTAT	298	60
	ispD_r	CCTGATGGATGGTTCGGGTGAG		60
gcpE	gcpE_f	AACTTCATCGCCTGCCCGAC	300	64
	gcpE_r	CAATTCGACGCGCTTCGTCC		64
dxs	dxs_f	TGATGCCAGAAGCGGCGAAAG	300	62
	dxs_r	TTGGCTTCCATACCAGCGGC		64
ACTINA	<i>Actina_forward</i>	GCCGGTATTGACCAAACACTAC	~200	54
	<i>Actina_reverse</i>	GGTGATTTCCTTTTGCATTC		57

Para cada um dos genes da via do MEP, mRNA foram especificamente detectados na *S. cerevisiae* YIP-DV-02 em uma fase de cultivo tardia após exaustão da galactose. Nenhuma banda foi observada na cepa controle YIP-0V-02 não transformada com genes da via do MEP (Fig 4). Este experimento mostra claramente que os 7 genes da via do MEP são expressos na cepa YIP-DV-02.

Exemplo 9: Efeito da lovastatina no crescimento em frascos com agitação de *S. cerevisiae* expressando a via do MEP

A fim de testar a funcionalidade da via do MEP na cepa de *S. cerevisiae* que abriga a via do MEP a partir de *E. coli*, lovastatina (mevinolina) foi usada como inibidor da via do mevalonato. Entretanto, a lovastatina é uma lactona inativa, mas na forma hidrolisada, ela age como um inibidor extremamente potente da HMG-CoA redutase. A lovastatina foi hidrolisada em NaOH etanólico [15% (v/v) etanol, 0,25% (p/v) NaOH] a 60°C em banho-maria por 1 h. Após o resfriamento, a solução estoque de lovastatina 20 mg/ml foi esterilizada por filtro e armazenada a -20°C para o uso subsequente.

Tubos de teste contendo o meio mínimo definido (Verduyn et al., 1992, Yeast 8:501), diferentes níveis de lovastatina e 20 g/L de galactose como fonte de carbono foram inoculados a partir de uma pré-cultura para uma densidade ótica (OD) a 600 nm de 0,01 e incubados a 30°C e 150 rpm, e o crescimento foi acompanhado medindo-se a OD (Fig. 5). Observou-se que a cepa que abriga a via do MEP e a valenceno sintase (*S. cerevisiae* YIP-DV-02) demonstrou melhor crescimento na presença de lovastatina, comparada com as cepas controle somente com a via do mevalonato nativa e a valenceno sintase (YIP-0V-01). A cepa controle parou completamente de crescer após 20 horas em uma OD de cerca de 12, enquanto que a cepa expressando a via do MEP continuou a crescer por mais de 60 horas e atingiu uma OD de cerca de 30 (Fig. 5). Isto mostra claramente que a via do MEP de *E. coli* é funcionalmente expressa na cepa *S. cerevisiae* YIP-DV-01.

Exemplo 10 Fermentação de duas fases para separação de isoprenóides *in situ*

Para acumular eficientemente os terpenos hidrofóbicos e altamente voláteis, uma fermentação de duas fases com solventes orgânicos imiscíveis e

biocompatíveis como a segunda fase pode ser usada. A fermentação de duas fases tem sido usada para separação de alguns metabólitos *in situ* em fermentações (Frenz et al., 1989, *Enzyme Microb. Technol.* 11:717; Sim et al., 2001, *Biotechnol. Lett.* 23:201). Neste exemplo, dodecane foi usado para separação *in situ* de valenceno. A produção de valenceno por *S. cerevisiae* expressando a via do MEP e valenceno sintase (YIP-DV-02) foi investigada. Como referência, a cepa que expressava somente a valenceno sintase (YIP-0V-01) também foi cultivada. Na primeira cepa, a valenceno sintase é expressa a partir de um promotor indutível por galactose, enquanto que na última cepa, a valenceno sintase é expressa a partir do promotor constitutivo de *TPI1*. Isto significa que as diferenças observadas nos níveis de produção de valenceno entre as cepas são tanto um efeito da via do MEP quanto potencialmente também do promotor da valenceno sintase.

Com o fim de determinar a produção de terpeno por matéria seca de microorganismo (biomassa), é aplicado o procedimento a seguir:

15 Frascos Erlenmeyer de 500 ml *baffled* [específicos para agitação], tampados com algodão, contendo 100 ml do meio mínimo definido (Verduyn et al., 1992, *Yeast* 8:501) e 15 g/L de galactose foram inoculados, para uma densidade óptica (OD) a 600 nm de 0,05 com culturas noturnas das cepas YIP-0V-01 ou YIP-DV-02 e incubados a 30°C e 150 rpm. Quando a OD a 600 nm atingia 1,0, 10 ml de dodecano (equivalentes a 10% do meio de cultura) foram adicionados a cada frasco com agitação. O dodecano não apresentou nenhum efeito significativo no crescimento (dados não mostrados). Ao final da fase logarítmica, uma vez que a galactose tivesse sido esgotada, os meios eram centrifugados e a fase orgânica superior era analisada através de GC-MS [cromatografia gasosa com espectrometria de massa] quanto a valenceno (ver abaixo). A OD era verificada a cada hora após a

adição de dodecano. O instante de esgotamento da galactose é quando a medição da OD revela pela primeira vez que o crescimento exponencial terminou.

Os resultados são dados na Tabela 6. Este experimento comprovou a possibilidade de usar fermentação de duas fases para separação *in situ* de valenceno como isoprenóide volátil. A Tabela 5 mostra que a cepa que abriga a via do MEP acumulou aproximadamente 10 vezes mais valenceno comparada com a cepa que expressava somente a via do mevalonato endógeno (MEV).

Tabela 6: fermentação de duas fases para avaliar a produção de valenceno pelas cepas YIP-0V-01 e YIP-DV-02 no crescimento do lote em frascos com agitação com 15 g/L de galactose

Cepa	Conc. de valenceno ($\mu\text{g/L}$)	Rendimento ($\mu\text{g/gPS}$)	Produtividade ($\mu\text{g/L/h}$)
YIP-0V-01	19,5	5,3	1,2
YIP-DV-02	186	39,9	8,3

Para a análise e quantificação do terpeno, uma combinação de espectrometria de massa e cromatografia gasosa era usada conforme detalhado abaixo:

Um cromatógrafo a gás Finnigan Focus equipado com espectrômetro de massa Finnigan Focus DSQ e uma coluna capilar ZB-5ms (30 m \times 250 μm DI \times 0,25 μm espessura do filme, Phenomenex) foi usado para a análise das amostras. A análise de GC-MS foi realizada usando um programa de temperatura da estufa do GC [cromatógrafo a gás] de 80°C durante 1 min, uma rampa de 10°C/min até 130°C seguida por uma rampa de 3°C/min até 160°C e, finalmente uma rampa de 10°C/min até 270°C e mantendo a temperatura em 270°C durante 5 min. 1 ml/min de hélio era aplicado como gás transportador. A GC-MS foi realizada no modo splitless durante

0,8 min e depois a *split valve* [válvula bifurcada] era aberta com 50 ml/min de *split flow*.

A biomassa era determinada como peso celular seco através do uso de filtros de nitrocelulose com tamanho de poro 0,45 μm (Gelman Sciences, Ann Arbor, MI).

- 5 Primeiramente, os filtros eram previamente secos em um forno de microondas a 180 W durante 10 min, e pesados. Um volume conhecido de cultura de células era filtrado e, depois, o resíduo era lavado com água destilada. Finalmente, o filtro era secado no microondas a 180 W durante 15 min, e pesado.

A concentração de terpeno por biomassa era calculada conforme segue: A
10 concentração correspondente nos 100 ml de meio de cultura dada na Tabela 3 era calculada como $C = 0,01 * C_v / 0,1 = C_v / 10$, com C_v sendo a concentração de valenceno na fase de dodecano estabelecida por GC-MS conforme indicado acima. O rendimento de terpeno (valenceno) na biomassa era calculado como a concentração acumulada de valenceno dividida pela concentração acumulada de
15 biomassa (a partir do instante de adição do dodecano até o instante de esgotamento da galactose). Rendimento = $(C_v / 10) / (X_t - X_0)$, onde X_t é a concentração de biomassa no instante de esgotamento da galactose (e quantificação do valenceno), e X_0 é a concentração de biomassa no instante de adição do dodecano. A produtividade era calculada como a concentração acumulada de valenceno dividida
20 pelo tempo de acumulação. Produtividade = $(C_v / 10) / (T_t - T_0)$, onde T_t é o instante de esgotamento da galactose (e quantificação do valenceno) e T_0 é o instante de adição do dodecano.

O experimento mostrou que o valenceno foi produzido por YIP-DV-02 em um rendimento de 39,9 μg de valenceno por g de peso seco de biomassa produzida,
25 durante a fase exponencial de crescimento aeróbico do lote na galactose. Isto

correspondeu a uma produtividade volumétrica de 8,3 µg por L de meio por hora (Tabela 6).

Exemplo 11: Construção de uma cepa de *S. cerevisiae* expressando a via do MEP a partir de *E. coli* e apresentando deleção de um gene essencial na via do mevalonato

Saccharomyces cerevisiae YIP-00-02 (MATa *ura3 trp1*) é usado para construir uma cepa com deleção de um gene essencial da via do mevalonato, através da transformação com um cassete de deleção. Um cassete de deleção para o gene de *S. cerevisiae* *ERG13* é gerado por ampliação de PCR do marcador *K.I. URA3* a partir do plasmídeo pWJ1077 (Reid et al., 2002, *Methods Enzymol.* 350, 258-277), com primers contendo saliências para um subsequente PCR de fusão com as regiões anteriores e posteriores do *ERG13* no genoma de *S. cerevisiae*. Essas regiões são obtidas através de PCR usando genoma de *S. cerevisiae* como modelo (Figura 6 e Tabela 7). Os 4 fragmentos obtidos são combinados por PCR de fusão para obter 2 fragmentos superpostos para parte do marcador *K.I. URA3*. A PCR é realizada de acordo com as condições padrão *Expand High Fidelity* (Roche Applied Science). Os produtos de PCR são purificados usando o Kit de Purificação de Produto de PCR Altamento Puro (Roche Applied Science) após cada PCR e etapa de PCR de fusão.

Tabela 7: Primers usados para deleção do *ERG13*

Primer	Seqüência
ERG13up_f	GACGAACTGGATGAGATGG
ERG13up_Pr-b	gatccccgggaattgccatgGAGAGTTTCATGCTGCACC
Pr-b-KL	catggcaattccccggggatcGTGATTCTGGGTAGAAGATCG
5'int	CTTGACGTTCGTTGCGACTGATGAGC

dKI3'	gtcagcggccgcacccctgcCCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTG
3'int	GAGCAATGAACCCAATAACGAAATC
ERG13dw_dKI3'	gcagggatgcggccgctgacCGATTGCATCTTGCTGAACCC
ERG13_dw_r	CCAGAGGTCAAATTCCTC

Os adaptamers são exibidos com letras minúsculas.

Os fragmentos de DNA resultantes são usados para transformar *S. cerevisiae* YIP-00-02 usando métodos padrão (Gietz e Woods, 2002) e graças à recombinação homóloga in vivo, o *ERG13* é deletado. Os transformadores Δ *ERG13* são
5 selecionados em meio SC-ura suplementado com mevalonato (50 mg/L), ergosterol (10 mg/L) e Tween80 (0,5%). A correta deleção do *ERG13* é verificada através de PCR diagnóstica após isolamento do DNA total a partir de cada transformador (Sambrook e Russell, 2000) e fenotipando o crescimento na presença/ausência de mevalonato, ergosterol ou Tween80. A cepa de *S. cerevisiae* MATa *trp1* Δ *erg13* é
10 obtida e denominada YIP-M0-06.

O requisito de metabólito de *S. cerevisiae* YIP-M0-06 (MATa *trp1* Δ *erg13*) pode ser superado pela introdução da via do MEP a partir de *E. coli*, após ter laçado o marcador *K.l. URA3* por cultivo em meio sintético suplementado com ácido 5-fluoro-
15 orótico (5-FOA) (6,7 g/L base de nitrogênio para levedura sem aminoácidos, 2 g/L menos a mescla de retirada de ura, 50 mg/L uracil, 1 g/L 5-FOA, 2% glicose, 2% agar). Através da transformação desta cepa com plasmídeos pIP001 e pIP002, pIP001 e pIP003, pIP001 e pIP004, pIP001 e pIP005, ou pIP001 e pIP006, as cepas YIP-DV-04 (Δ *erg13*, via do MEP e valenceno sintase), YIP-DC-03 (Δ *erg13*, via do
20 MEP e cubebol sintase), YIP-DC-04 (Δ *erg13*, via do MEP e cubebol sintase otimizada por códon), YIP-DP-03 (Δ *erg13*, via do MEP e patchoulol sintase) e YIP-DP-04 (Δ *erg13*, via do MEP e patchoulol sintase otimizada por códon) são obtidos,

respectivamente.

Exemplo 12: Construção de uma cepa de *S. cerevisiae* produtora de licopeno, expressando a via do MEP a partir de *E. coli*

Uma variante *ura3* de *S. cerevisiae* YIP-D0-01 foi primeiramente selecionada
5 plaqueando esta cepa em meio sintético suplementado com ácido 5-fluoro-orótico (5-FOA) (6,7 g/L base de hidrogênio para levedura sem aminoácidos, 2 g/L menos a de retirada de ura, 50 mg/L uracil, 1 g/L 5-FOA, 2% glicose, 2% agar). A cepa YIP-D0-01 (MATa *ura3* MEP) selecionada é usada para expressão dos genes para produção de licopeno.

10 Os genes biossintéticos de licopeno foram derivados de genes *crtE* (acesso Genebank no. AAA21260), *crtB* (acesso Genebank no. AAA21264) e *crtl* (acesso Genebank no. AAA21263) de *Erwinia herbicola* que codificam, respectivamente, uma geranylgeranyl difosfato sintase, um fitoeno sintase e uma fitoeno desaturase. As seqüências nucleotídicas dos genes biossintéticos de licopeno foram modificadas
15 para otimizar sua expressão na levedura. Os códons foram modificados sem mudar as seqüências de aminoácidos. Os três genes *crt* otimizados por códon foram sintetizados com locais de restrição apropriados adicionados a suas extremidades e principalmente clonados no plasmídeo pCR4TOPO (Invitrogen) e os genes que produzem os plasmídeos *crtE*, *crtB* e *crtl* foram denominados pIP033, pIP034 e
20 pIP035, respectivamente (Figura 7).

Os genes *crt* no plasmídeo pCR4TOPO foram digeridos usando enzimas de restrição e foram subclonados nos vetores de expressão de levedura pESC-URA e pESC-HIS (Stratagene). Os DNA de plasmídeo pIP033 e pESC-URA foram digeridos com enzimas de restrição *SacI* e *NotI*, e submetidos a eletroforese de agarose com
25 gel. Os fragmentos resultantes foram purificados com gel usando o Kit de Purificação

GFX Gel Band (Amersham Biosciences), ligado *in vitro*, seguido pela transformação em *E. coli*, seleção dos transformadores e verificação dos transformadores através de análise de perfil de restrição e seqüenciamento. A partir de transformadores exibindo ligação correta do gene *crtE* com o vetor pESC-URA, o plasmídeo pIP036
5 era purificado e armazenado.

Os DNA de plasmídeo pIP035 e pESC-HIS foram subseqüentemente digeridos com enzimas de restrição SacI e SpeI. Os fragmentos resultantes foram purificados com gel, ligados *in vitro*, seguidos pela transformação em *E. coli*, seleção dos transformadores e verificação dos transformadores através de perfilagem de
10 restrição e seqüenciamento. Os transformadores com a ligação correta do gene *crtI* com o vetor pESC-HIS foram usados para purificar o plasmídeo (pIP037).

Os DNA de plasmídeo pIP034 e pIP037 foram subseqüentemente digeridos com enzimas de restrição Sall e XhoI e o plasmídeo pIP038 (gene *crtB* com o vetor pIP037) foi obtido da mesma maneira indicada anteriormente, purificado e
15 armazenado.

Para reduzir a instabilidade do plasmídeo e facilitar a integração posterior dos genes no genoma de *S. cerevisiae*, os 2 plasmídeos (pIP036 e pIP38) foram combinados juntos de modo a obter o plasmídeo pIP039. A combinação dos dois plasmídeos foi feita usando o método de reparo de gap em *S. cerevisiae* (DeMarini
20 *et al*, 2001, BioTechniques 30:520-52). Para construir o plasmídeo pIP039, o pedaço de DNA contendo promotores de *crtI*, *crtB*, *GAL1*, *GAL10* e terminadores de *GAL10*, *CYC1* e *ADH1* (pIP038) foi ampliado através de PCR usando os primers *pfus_grf* e *pfus_grr* (Tabela 1). O produto de PCR resultante foi purificado usando o Kit de Purificação de Produto de PCR Altamente Puro (Roche Applied Science). O
25 plasmídeo pIP036 (pESC-URA contendo *crtE*) foi digerido por MfeI e

subseqüentemente purificado após eletroforese com gel usando o Kit de Extração por Gel QIAEX[®] II (Qiagen). O plasmídeo purificado e digerido junto com os produtos de PCR foi usado na transformação de *S. cerevisiae* YIP-00-03 (MATa *ura3*). Os transformadores foram selecionados em placas contendo meio SC-ura. Após 2-3 dias de incubação a 30°C, todos os transformadores foram inoculados em um único tubo de ensaio contendo 5 mL de SC-ura e incubados 12 h a 30°C. A partir deste cultivo, o DNA total foi isolado e utilizado depois para transformar quimicamente as células competentes de *E. coli* DH5 α . Os transformadores foram selecionados em placas contendo meio LB suplementado com ampicilina. Os transformadores foram depois verificados para purificar os plasmídeos e realizar a digestão enzimática com enzimas de restrição adequadas. No caso de transformadores contendo o plasmídeo esperado, 1 μ g de DNA de plasmídeo era purificado e enviado para seqüenciamento. O plasmídeo resultante pESC-URA contendo genes *crtE*, *crtB* e *crtI* foi obtido e denominado pIP039. A Figura 8 mostra diferentes genes crt contendo o vetor pESC construído.

Uma cepa de *S. cerevisiae* produtora de licopeno, expressando a via do MEP a partir de *E. coli*, é construída transformando *S. cerevisiae* YIP-D0-01 (MATa *ura3* MEP) com o plasmídeo pIP039 construído contendo *crtE*, *crtI* e *crtB*. A cepa resultante é YIP-DK-01.

20 **Aplicabilidade industrial**

O microorganismo da presente invenção é útil para a produção de compostos complexos de terpeno, seus precursores e seus derivados.

LISTAGEM DE SEQÜÊNCIAS

TITULAR: FIRMENICH SA

ENDEREÇO: 1 ROUTE DES JEUNES, 1211 GENEVA 8 SUÍÇA

PRIORIDADE: PCT/IB2006/050476, datado de 14.02.2006

5 TÍTULO DA INVENÇÃO: MÉTODO PARA PRODUZIR TERPENOS E, PORTANTO,
MICROORGANISMOS TRANSFORMADORES POR MEP.

FORMATO PARA LEITURA EM COMPUTADOR: PATENTIN VERSÃO 3.3

NÚMERO DE SEQÜÊNCIA CONSTANTE NO PEDIDO: 46

NÚMERO IDENTIFICADOR DA SEQÜÊNCIA: 1

10 TAMANHO: 31

TIPO: DNA

NOME: Artificial

1

ggactagtcc taatgaagca actcaccatt c 31

15 NÚMERO IDENTIFICADOR DA SEQÜÊNCIA: 2

TAMANHO: 29

TIPO: DNA

NOME: Artificial

2

20 ccatcgatgg tcagcttgcg agacgcac 29

NÚMERO IDENTIFICADOR DA SEQÜÊNCIA: 3

TAMANHO: 52

TIPO: DNA

NOME: Artificial

25 3

actttaacgt caaggagaaa aaaccccgga tcccatgagt ttgatattg cc 52

NÚMERO IDENTIFICADOR DA SEQÜÊNCIA: 4

TAMANHO:55

TIPO: DNA

5 NOME: Artificial

4

ttcttcggaa atcaacttct gttccatgtc gacgccttat gccagccagg ccttg 55

NÚMERO IDENTIFICADOR DA SEQÜÊNCIA: 5

TAMANHO: 31

10 TIPO: DNA

NOME: Artificial

5

ggactagtcc taatggcaac cactcatttg g 31

NÚMERO IDENTIFICADOR DA SEQÜÊNCIA: 6

15 TAMANHO: 29

TIPO: DNA

NOME: Artificial

6

ccatcgatgg ttatgtattc tctgatgg 29

20 NÚMERO IDENTIFICADOR DA SEQÜÊNCIA: 7

TAMANHO: 54

TIPO: DNA

NOME: Artificial

7

25 actttaacgt caaggagaaa aaaccccgga tcccatgcgg acacagtggc cctc 54

NÚMERO IDENTIFICADOR DA SEQÜÊNCIA: 8

TAMANHO: 57

TIPO: DNA

NOME: Artificial

5 8

ttcggaaatc aacttctggt ccatgtcgac gccttaaagc atggctdgt gcaatgg 57

NÚMERO IDENTIFICADOR DA SEQÜÊNCIA: 9

TAMANHO: 29

TIPO: DNA

10 NOME: Artificial

9

ggactagtcc taatgcgaat tggacacgg 29

NÚMERO IDENTIFICADOR DA SEQÜÊNCIA: 10

TAMANHO: 29

15 TIPO: DNA

NOME: Artificial

10

ccatcgatgg tcatttgggt gccttaatg 29

NÚMERO IDENTIFICADOR DA SEQÜÊNCIA: 11

20 TAMANHO: 34

TIPO: DNA

NOME: Artificial

11

ggactagtcc taatgcataa ccaggctcca attc 34

25 NÚMERO IDENTIFICADOR DA SEQÜÊNCIA: 12

TAMANHO: 30

TIPO: DNA

NOME: Artificial

12

5 cgagctcgtt attttcaac ctgctgaacg 30

NÚMERO IDENTIFICADOR DA SEQÜÊNCIA: 13

TAMANHO: 36

TIPO: DNA

NOME: Artificial

10 13

gcgctgacgt ctgatgcag atcctgttg ccaacc 36

NÚMERO IDENTIFICADOR DA SEQÜÊNCIA: 14

TAMANHO: 33

TIPO: DNA

15 NOME: Artificial

14

ccctcgaggg ttaatcgac ttcacgaata tcg 33

NÚMERO IDENTIFICADOR DA SEQÜÊNCIA: 15

TAMANHO: 59

20 TIPO: DNA

NOME: Artificial

15

cagcactacc ctttagctgt tctatgtct gccactccta cgcaaaccgc ctctccccg 59

NÚMERO IDENTIFICADOR DA SEQÜÊNCIA: 16

25 TAMANHO: 58

TIPO: DNA

NOME: Artificial

16

aggaaatgat agcattgaag gatgagacta atccaattat cgggtcgggc ctcttcgc 58

5 NÚMERO IDENTIFICADOR DA SEQÜÊNCIA: 17

TAMANHO: 38

TIPO: DNA

NOME: Artificial

17

10 cgggatcccg tgggccctat ggcactcaa gattcaga 38

NÚMERO IDENTIFICADOR DA SEQÜÊNCIA: 18

TAMANHO: 34

TIPO: DNA

NOME: Artificial

15 18

aagacgtcga cgctcaaaa gggaacaggc ttct 34

NÚMERO IDENTIFICADOR DA SEQÜÊNCIA: 19

TAMANHO: 38

TIPO: DNA

20 NOME: Artificial

19

cgggatcccg tgggccctat gtcgtctgga gaaacatt 38

NÚMERO IDENTIFICADOR DA SEQÜÊNCIA: 20

TAMANHO: 34

25 TIPO: DNA

NOME: Artificial

20

aagacgtcga cgctcaaaa tggaacgtgg tctc

34

NÚMERO IDENTIFICADOR DA SEQÜÊNCIA: 21

5 TAMANHO: 59

TIPO: DNA

NOME: Artificial

21

actttaacgt caaggagaaa aaaccccgga tccaatggag ttgtatgccc aaagtgtg 59

10 NÚMERO IDENTIFICADOR DA SEQÜÊNCIA: 22

TAMANHO: 64

TIPO: DNA

NOME: Artificial

22

15 ttcttcggaa atcaacttct gttccatgtc gacgccttaa tatggaacag ggtgaaggta 60

caac

64

NÚMERO IDENTIFICADOR DA SEQÜÊNCIA: 23

TAMANHO: 20

TIPO: DNA

20 NOME: Artificial

23

cagtgattca ctcaatggtg

20

NÚMERO IDENTIFICADOR DA SEQÜÊNCIA: 24

TAMANHO: 22

25 TIPO: DNA

NOME: Artificial

24

acgcatcacc tctttctgg cg

22

NÚMERO IDENTIFICADOR DA SEQÜÊNCIA: 25

5 TAMANHO: 22

TIPO: DNA

NOME: Artificial

25

ctggcagaac aggcggaagt tg

22

10 NÚMERO IDENTIFICADOR DA SEQÜÊNCIA: 26

TAMANHO: 21

TIPO: DNA

NOME: Artificial

26

15 acgcagctct ttcggcactt c

21

NÚMERO IDENTIFICADOR DA SEQÜÊNCIA: 27

TAMANHO: 20

TIPO: DNA

NOME: Artificial

20 27

gctccatgcg ttgaccgatg

20

NÚMERO IDENTIFICADOR DA SEQÜÊNCIA: 28

TAMANHO: 22

TIPO: DNA

25 NOME: Artificial

28

ccggtaaadc ccagttttc cg

22

NÚMERO IDENTIFICADOR DA SEQÜÊNCIA: 29

TAMANHO: 22

5 TIPO: DNA

NOME: Artificial

29

taaagatcct gaactccgc gc

22

NÚMERO IDENTIFICADOR DA SEQÜÊNCIA: 30

10 TAMANHO: 20

TIPO: DNA

NOME: Artificial

30

catggctctg tgcaatgggg

20

15 NÚMERO IDENTIFICADOR DA SEQÜÊNCIA: 31

TAMANHO: 21

TIPO: DNA

NOME: Artificial

31

20 cgcaccagtg cgcgatacta t

21

NÚMERO IDENTIFICADOR DA SEQÜÊNCIA: 32

TAMANHO: 22

TIPO: DNA

NOME: Artificial

25 32

cctgatggat ggttcgggtg ag 22

NÚMERO IDENTIFICADOR DA SEQÜÊNCIA: 33

TAMANHO: 20

TIPO: DNA

5 NOME: Artificial

33

aacttcacg cctgcccgc 20

NÚMERO IDENTIFICADOR DA SEQÜÊNCIA: 34

TAMANHO: 20

10 TIPO: DNA

NOME: Artificial

34

caattcgacg cgcttcgtcc 20

NÚMERO IDENTIFICADOR DA SEQÜÊNCIA: 35

15 TAMANHO: 21

TIPO: DNA

NOME: Artificial

35

tgatgccaga agcggcgaaa g 21

20 NÚMERO IDENTIFICADOR DA SEQÜÊNCIA: 36

TAMANHO: 20

TIPO: DNA

NOME: Artificial

36

25 ttggctcca taccagcggc 20

NÚMERO IDENTIFICADOR DA SEQÜÊNCIA: 37

TAMANHO: 20

TIPO: DNA

NOME: Artificial

5 37

gccggtattg accaaactac 20

NÚMERO IDENTIFICADOR DA SEQÜÊNCIA: 38

TAMANHO: 20

TIPO: DNA

10 NOME: Artificial

38

ggtgatttcc ttttgcattc 20

NÚMERO IDENTIFICADOR DA SEQÜÊNCIA: 39

TAMANHO: 19

15 TIPO: DNA

NOME: Artificial

39

gacgaactgg atgagatgg 19

NÚMERO IDENTIFICADOR DA SEQÜÊNCIA: 40

20 TAMANHO: 39

TIPO: DNA

NOME: Artificial

40

gatccccggg aattgccatg gagagtttca tgctgcacc 39

25 NÚMERO IDENTIFICADOR DA SEQÜÊNCIA: 41

TAMANHO: 41

TIPO: DNA

NOME: Artificial

41

5 catggcaatt cccggggatc gtgattctgg gtagaagatc g 41

NÚMERO IDENTIFICADOR DA SEQÜÊNCIA: 42

TAMANHO: 25

TIPO: DNA

NOME: Artificial

10 42

cttgacgttc gttcgactga tgagc 25

NÚMERO IDENTIFICADOR DA SEQÜÊNCIA: 43

TAMANHO: 44

TIPO: DNA

15 NOME: Artificial

43

gtcagcggcc gcatccctgc cctcactaaa gggaacaaaa gctg 44

NÚMERO IDENTIFICADOR DA SEQÜÊNCIA: 44

TAMANHO: 25

20 TIPO: DNA

NOME: Artificial

44

gagcaatgaa cccaataacg aaatc 25

NÚMERO IDENTIFICADOR DA SEQÜÊNCIA: 45

25 TAMANHO: 41

TIPO: DNA

NOME: Artificial

45

gcagggatgc ggccgctgac cgattgcatc ttgctgaacc c 41

5 NÚMERO IDENTIFICADOR DA SEQÜÊNCIA: 46

TAMANHO: 19

TIPO: DNA

NOME: Artificial

46

10 ccagaggtca aattccctc 19

REIVINDICAÇÕES

1. **MICROORGANISMO RECOMBINANTE**, caracterizado por compreender uma via heteróloga para converter 1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato (DXP) em isopentenil difosfato (IPP) e/ou dimetilalil difosfato (DMAPP), o metabolismo nativo do dito
5 microorganismo sendo desprovido da dita via.
2. **MICROORGANISMO RECOMBINANTE** da reivindicação 1, caracterizado por ainda compreender um gene heterólogo para a produção de DXP.
3. **MICROORGANISMO RECOMBINANTE** da reivindicação 1 ou 2, caracterizado por compreender genes heterólogos da via do 2-metileritritol 4-fosfato
10 (MEP).
4. **MICROORGANISMO RECOMBINANTE** da reivindicação 2 ou 3, caracterizado por ser um fungo, preferivelmente do gênero *Sacharomyces*.
5. **MICROORGANISMO RECOMBINANTE** de qualquer uma das reivindicações precedentes caracterizado por compreender genes heterólogos que codificam uma
15 DXP-redutoisomerase, MEP citidililtransferase, CDP-ME quinase, MECDP sintase, MECDP redutase e HMBPP redutase funcionais.
6. **MICROORGANISMO RECOMBINANTE** da reivindicação 2, caracterizado por compreender genes heterólogos que codificam uma DXP-sintase, DXP-redutoisomerase, MEP citidililtransferase, CDP-ME quinase, MECDP sintase,
20 MECDP redutase e HMBPP redutase funcionais.
7. **MICROORGANISMO RECOMBINANTE** de qualquer das reivindicações precedentes, caracterizado por compreender ao menos um gene heterólogo que codifica uma terpeno sintase funcional.
8. **MICROORGANISMO RECOMBINANTE** da reivindicação 7, caracterizado
25 por fornecer um rendimento de pelo menos 100 µg de terpeno por g de peso seco

do microorganismo, na síntese do terpeno em um meio apropriado do microorganismo.

5 **9. MICROORGANISMO RECOMBINANTE** de qualquer das reivindicações precedentes, **caracterizado por** compreender ao menos um gene heterólogo que codifica uma mono, sesqui e/ou diterpeno sintase funcional.

10. MICROORGANISMO RECOMBINANTE de qualquer das reivindicações precedentes, **caracterizado pelos** genes da via heteróloga estarem presentes em plasmídeos no microorganismo.

10 **11. MICROORGANISMO RECOMBINANTE** da reivindicação 10, **caracterizado por** compreender dois plasmídeos, cada um compreendendo ao menos 3 genes da via heteróloga.

15 **12. MICROORGANISMO RECOMBINANTE** da reivindicação 10, **caracterizado por** compreender ao menos dois (2) plasmídeos que, tomados em conjunto, compreendem os genes *dxs*, *dxr*, *ispD*, *ispE*, *ispF*, *gcpE*, *lytB* e um gene que codifica a terpeno sintase.

13. MICROORGANISMO RECOMBINANTE da reivindicação 12, **caracterizado pelos** ditos genes serem transportados em dois plasmídeos.

20 **14. MICROORGANISMO RECOMBINANTE** de qualquer das reivindicações 1-9, **caracterizado pelos** genes que codificam a via heteróloga serem integrados ao genoma do microorganismo.

15. MICROORGANISMO RECOMBINANTE da reivindicação 4, **caracterizado por** ser a cepa de *Saccharomyces cerevisiae* YIP-DV-02 tendo número de depósito DSM 17900.

25 **16. MÉTODO** para acumular um terpeno na célula e/ou meio de um microorganismo, **caracterizado pelo** microorganismo ser um microorganismo

recombinante de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15.

17. **MÉTODO** da reivindicação 16, **caracterizado por** compreender a etapa de cultivar o microorganismo em um meio apropriado.

18. **MÉTODO** para produzir um terpeno, **caracterizado por** compreender a etapa
5 de cultivar o microorganismo de qualquer das reivindicações 1 – 15 em um meio apropriado para a produção do dito terpeno e, opcionalmente, isolando o terpeno a partir do meio e/ou do microorganismo.

19. **MÉTODO** da reivindicação 17 ou 18, **caracterizado pela** etapa de cultivar o
10 microorganismo ser realizada, ao menos parcialmente, via uma fermentação de duas fases.

20. **MÉTODO** para preparar um microorganismo recombinante capaz de acumular e/ou produzir um terpeno, **caracterizado por** compreender a etapa de transformação de um microorganismo desprovido da via do MEP nativa com genes de uma via do MEP heteróloga e ao menos um gene que codifica a terpeno sintase.

15 21. **MÉTODO** para aumentar a quantidade de precursores de terpeno em um microorganismo, desprovido da via do MEP nativa, **caracterizado por** compreender a etapa de transformação do dito microorganismo com genes de uma via do MEP heteróloga e opcionalmente ao menos um gene que codifica a terpeno sintase.

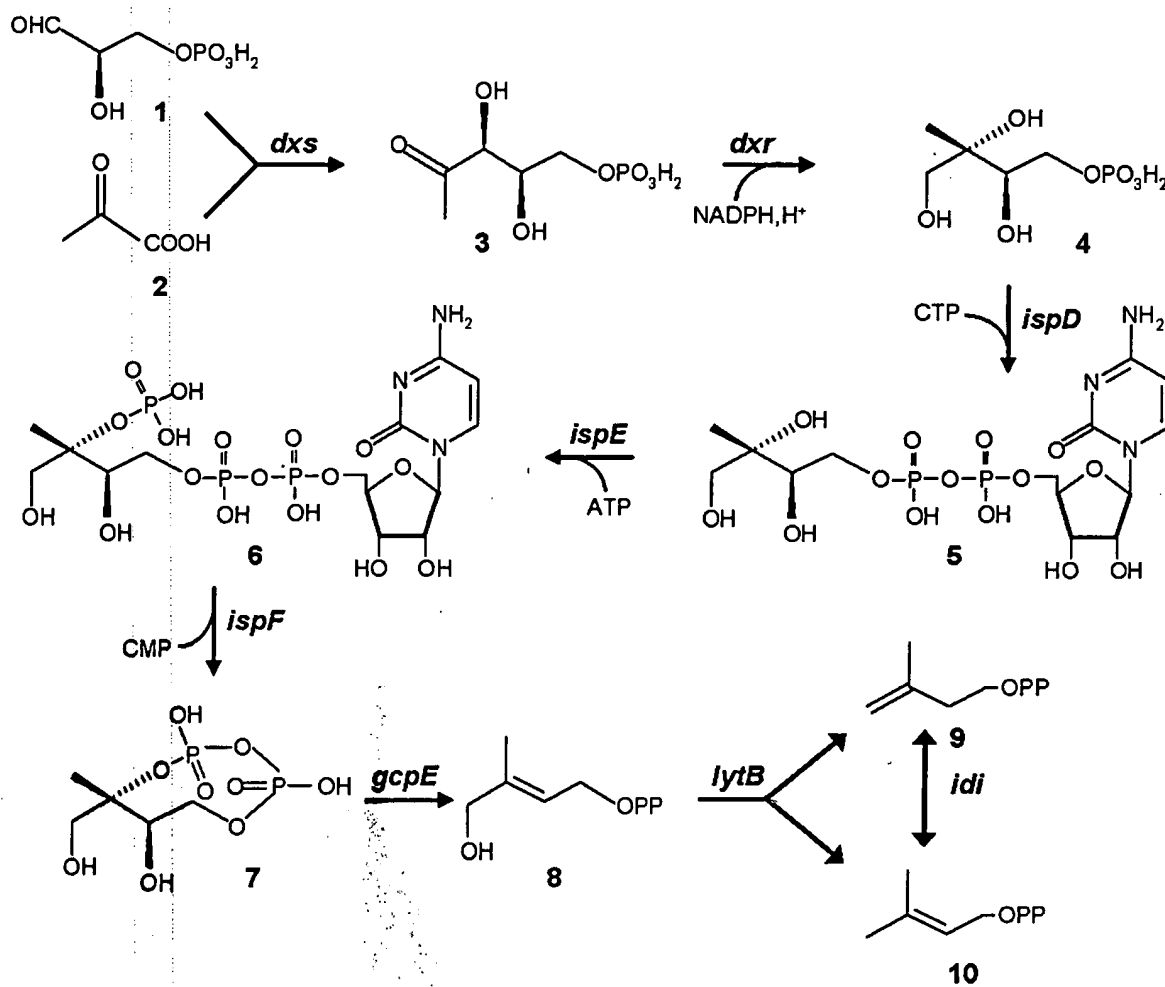


Fig. 1

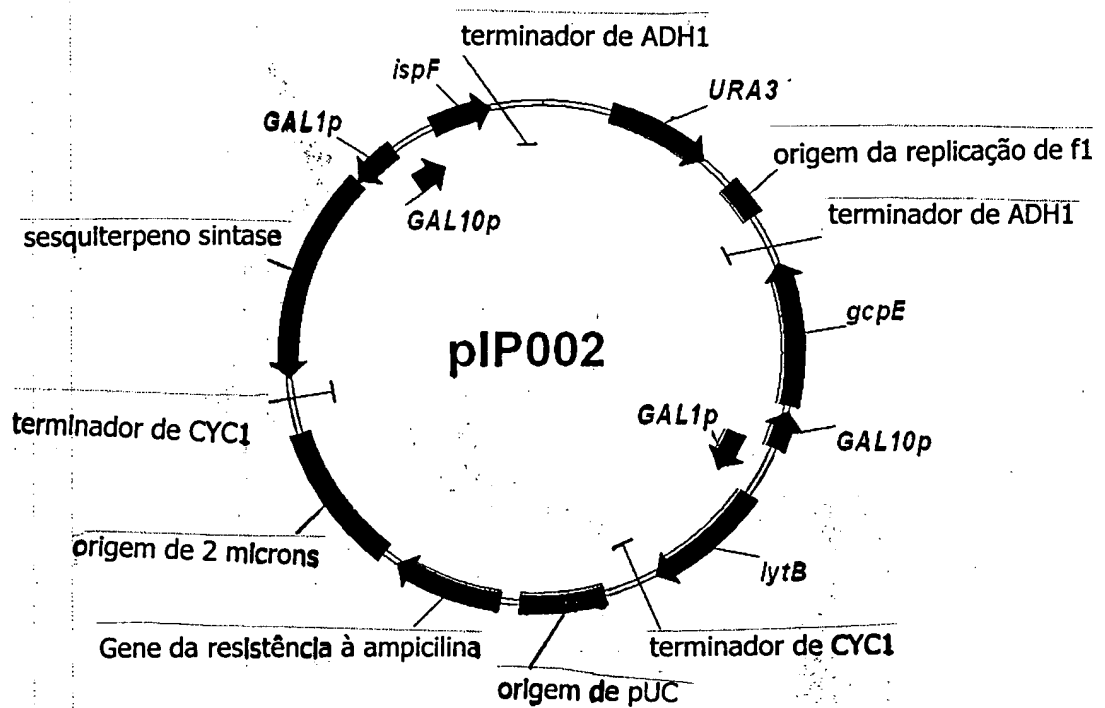
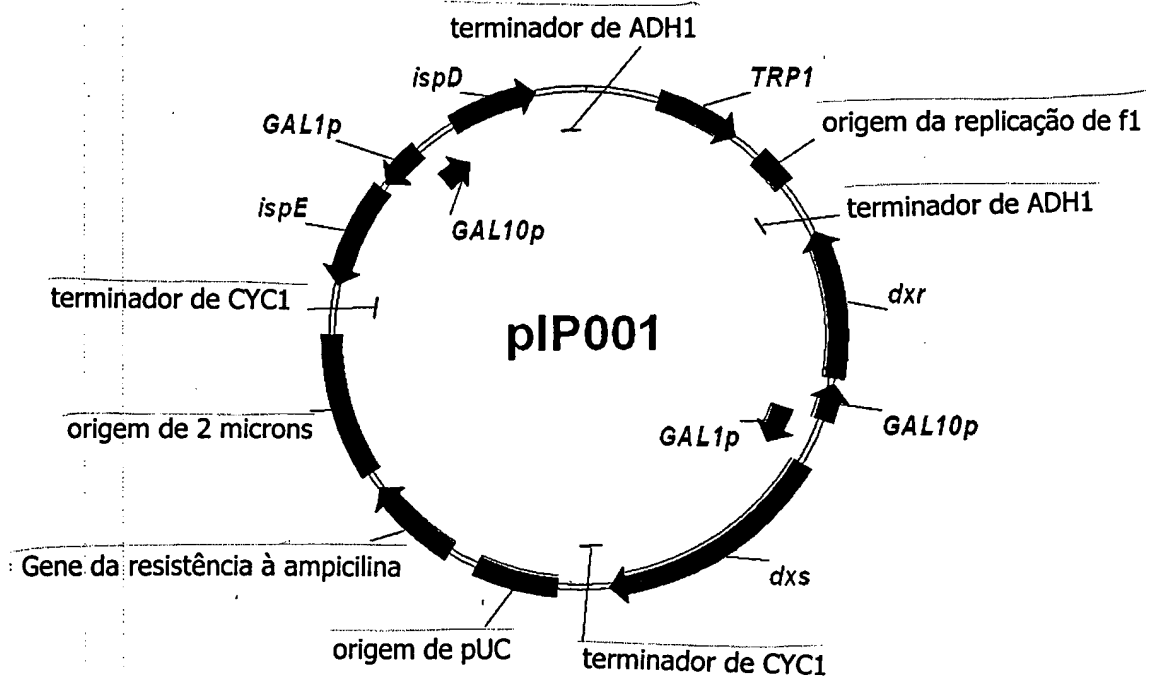


Fig. 2

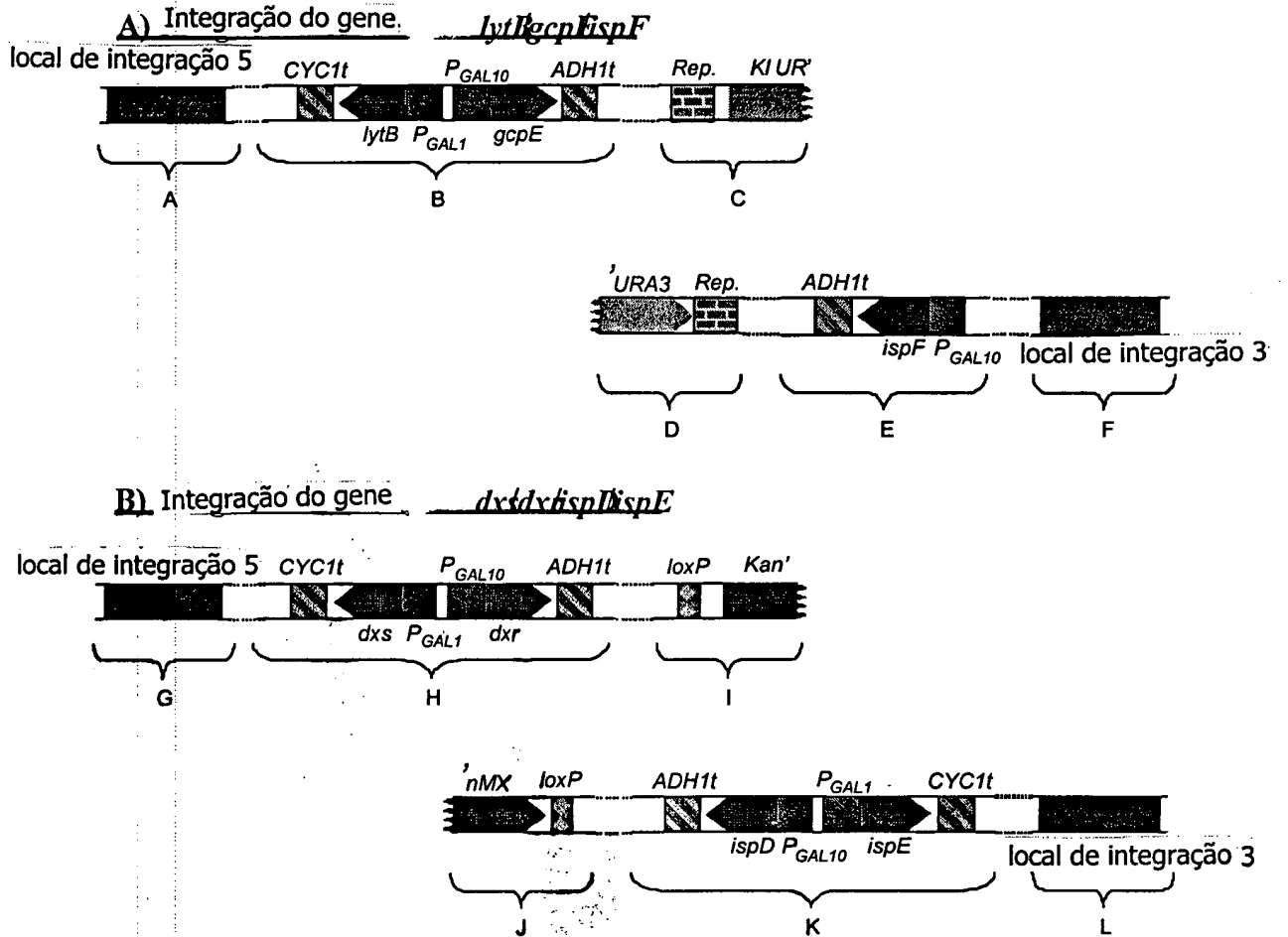


Fig. 3

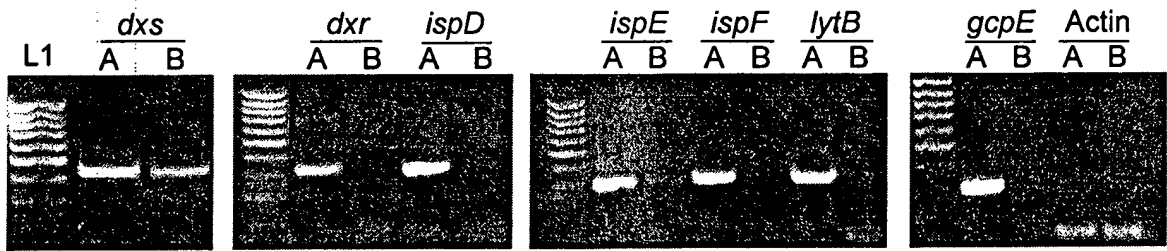


Fig. 4

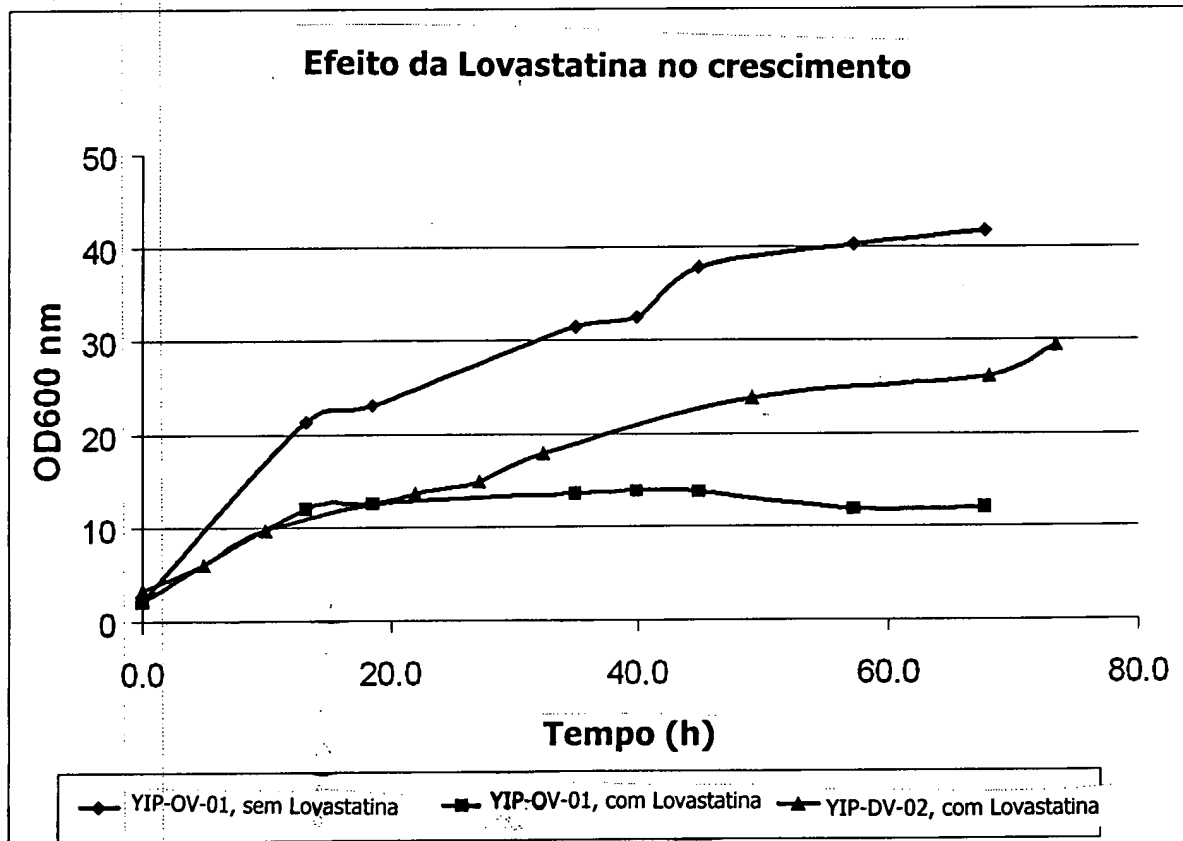


Fig. 5

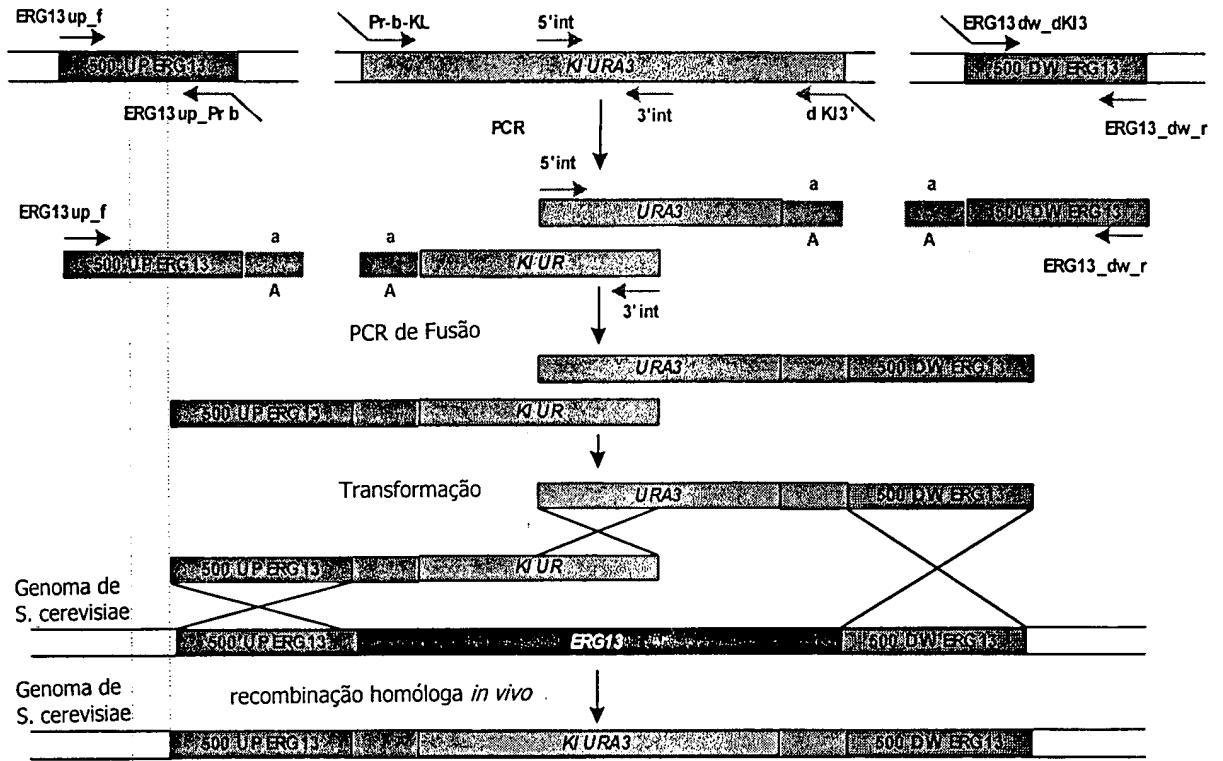


Fig. 6

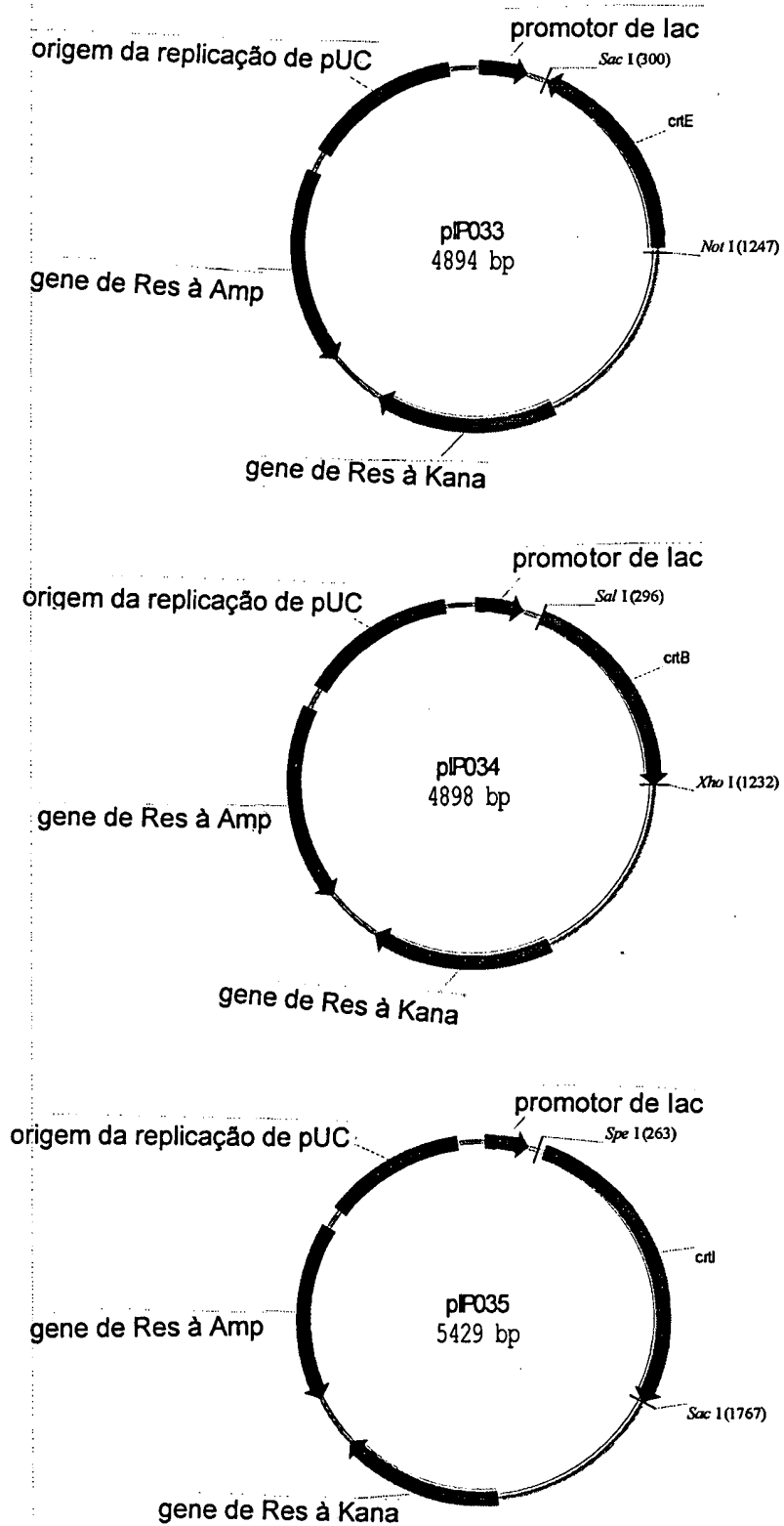
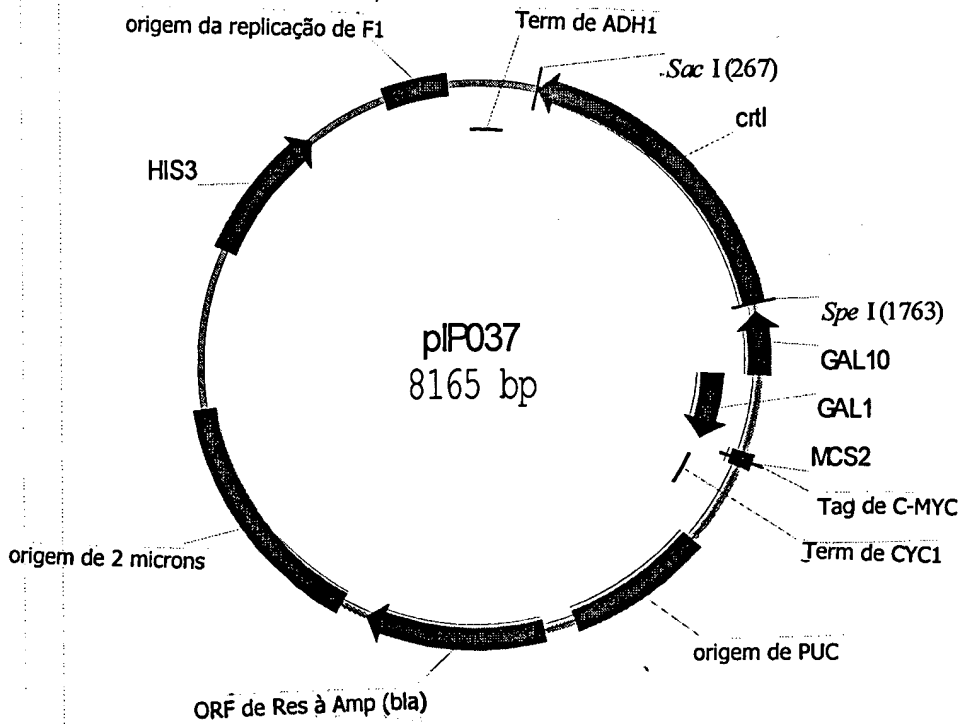
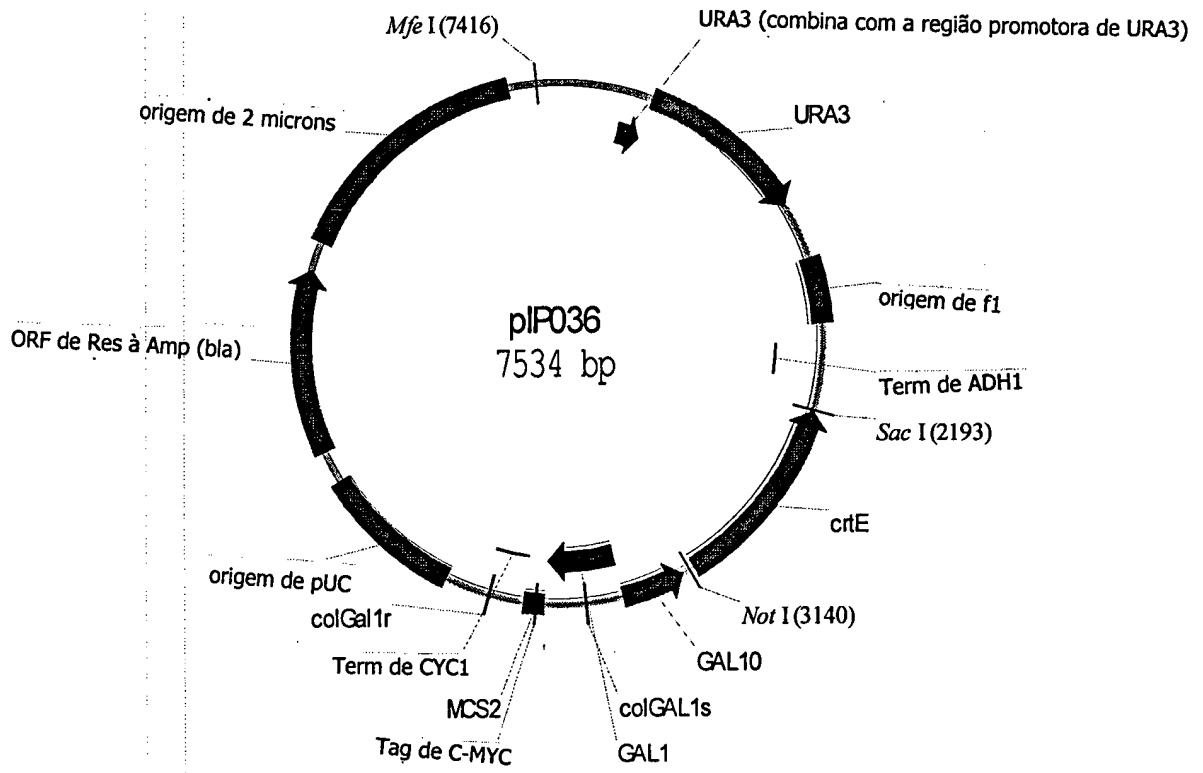
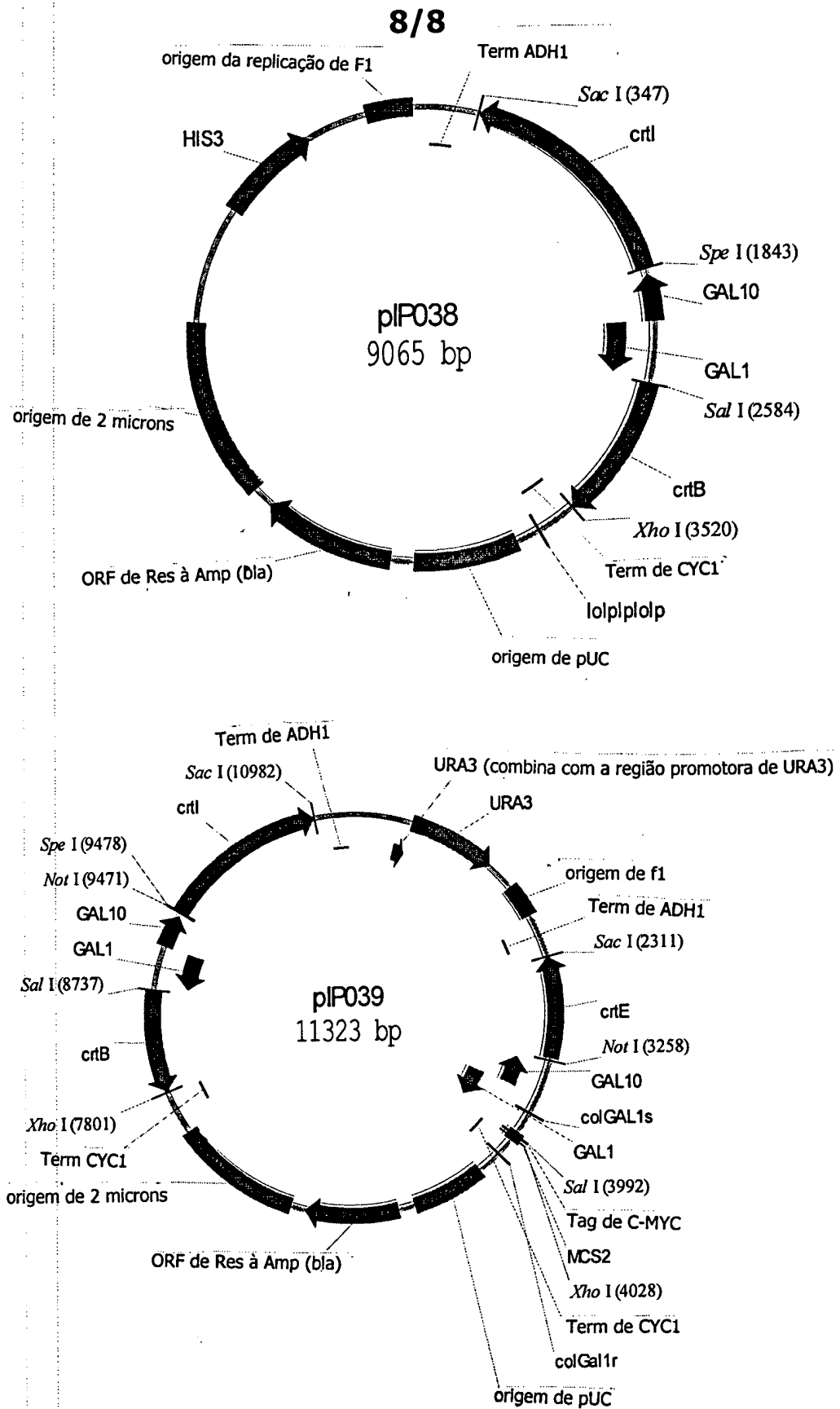


Fig. 7





RESUMO

“MÉTODO PARA PRODUZIR TERPENOS E, PORTANTO, MICROORGANISMOS TRANSFORMADOS POR MEP”. A presente invenção se relaciona com um microorganismo capaz de produzir um terpeno de escolha. O
5 microorganismo expressa uma via heteróloga para a formação de unidades de isoprene e, preferivelmente, uma terpeno sintase heteróloga. Desta forma, altas quantidades de terpeno podem ser isoladas a partir do meio do microorganismo.