



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

(21) PI 0806695-7 A2



* B R P I 0 8 0 6 6 9 5 A 2 *

(22) Data de Depósito: 11/01/2008
(43) Data da Publicação: 03/06/2014
(RPI 2265)

(51) Int.Cl.:
C12N 1/00

(54) Título: COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA AUMENTAR A TOLERÂNCIA À PRODUÇÃO DE PRODUTOS QUÍMICOS PRODUZIDOS POR MICROORGANISMOS

(57) Resumo:

(30) Prioridade Unionista: 12/01/2007 US 60/880,108

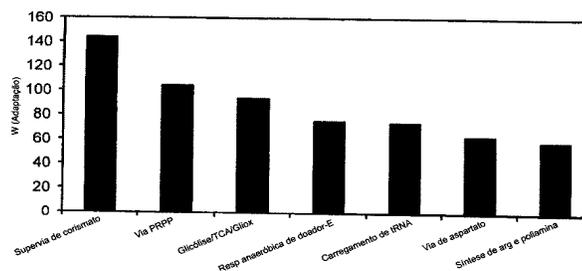
(73) Titular(es): THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF COLORADO

(72) Inventor(es): Michael D. Lynch, Ryan Gill, Tanya Warnecke

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2008050921 de 11/01/2008

(87) Publicação Internacional: WO 2008/089102de 24/07/2008



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA AUMENTAR A TOLERÂNCIA À PRODUÇÃO DE PRODUTOS QUÍMICOS PRODUZIDOS POR MICROORGANISMOS"**.

5 **PEDIDOS RELACIONADOS**

Esse pedido reivindica o benefício sob 35 U.S. C. §119(e) de pedido de patente provisório No. de série U.S. 60/880.108 depositado em 12 de janeiro de 2007, aqui incorporado a título de referência em sua totalidade.

PESQUISA DE FUNDO FEDERAL

10 As modalidades descritas aqui foram sustentadas em parte por concessão BES0228584 junto à National Science Foundation. O governo norte-americano pode possuir alguns direitos para praticar a presente invenção.

CAMPO

15 A presente invenção refere-se em geral a métodos, composições e usos para aumentar a tolerância e/ou produção de ácidos orgânicos e álcoois por microorganismos. Esse pedido também refere-se geralmente a métodos, composições e usos de vetores para aumentar a produção de ácidos orgânicos ou álcoois por um microorganismo. Algumas modalidades referem-se a composições e métodos para aumentar a tolerância a ácido 3-
20 hidroxipropiônico como um meio para aumentar a produção de ácido 3-hidroxipropiônico (3-HP) por bactérias. Em outras modalidades, as composições e métodos referem-se à regulação de uma ou mais moléculas inibidoras ou moléculas intensificadoras de uma supervia de corismato de um
25 microorganismo para aumentar a tolerância à produção de ácido orgânico pelo microorganismo.

ANTECEDENTES

Os custos do petróleo aumentaram muito nos últimos anos. Muitos especialistas acreditam agora que tais aumentos de custo continuarão e
30 que a capacidade de produção de petróleo irá atingir seu máximo em um futuro próximo. Fontes alternativas de materiais de baixo custo para a produção de combustíveis e outros produtos químicos devem ser desenvolvi-

das. A biorrefinação procura desenvolver recursos renováveis, tal como, resíduos agrícolas ou urbanos, para tais propósitos. O modelo básico envolve a conversão de material residual (por exemplo, milho) em açúcares (por exemplo, hexoses, pentoses) que pode ser fermentado por organismos elaborados para produzir produtos de valor agregado, tais como, combustíveis (por exemplo, etanol ou hidrogênio) ou produtos químicos de base (por exemplo, monômeros/polímeros). Embora ainda haja muita discussão com relação à viabilidade comercial a longo prazo de etanol como um substituto de gasolina, rotas biológicas para a produção de produtos químicos de base foram comprovadas como alternativas economicamente atraentes para rotas petroquímicas convencionais. Como um exemplo, a colaboração durante uma década da Dupont/Genencor levou a Dupont a investir no desenvolvimento de um processo à base de 800.000 litros de *E. coli* para a produção de 1,3 propanodiol (um produto estimado em \$5-8 bilhões/ano).

Os ácidos orgânicos representam uma plataforma importante de produtos químicos de biorrefinação futuros. Em um relatório liberado pelo National Renewable Energy Laboratory, oito ácidos orgânicos diferentes foram classificados entre os 12 produtos químicos de biorrefinação mais importantes de alto valor que incluem ácido 3-hidroxi propiônico (3-HP). Ainda há a necessidade de gerar rapidamente esses produtos químicos de biorrefinação em métodos eficientes de baixo custo.

SUMÁRIO

As presentes modalidades concernem métodos e composições para aumentar a tolerância à produção de composto orgânico por microorganismos. Algumas modalidades concernem aumentar a tolerância a produtos químicos de biorrefinação. Em outras modalidades, as composições e métodos concernem a produção de ácido 3-hidroxi propiônico (3-HP). Os microorganismos contemplados de uso aqui podem incluir, porém sem caráter limitativo, *E. coli*.

Os produtos da via podem incluir, porém sem caráter limitativo, um ou mais entre corismato, tirosina, fenilalanina, triptofano, folato, ubiquinona, meniquinona, chiquimato, D-Eritrose-4-fosfato, 3-deóxi-D-arabino-

heptulosonato-7-fosfato, 3-desidroquinato, 3-deidro-chiquimato, chiquimato, chiquimato-3-fosfato, 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato, corismato, isocorismato, prefenato, fenilpiruvato, para-hidroxifenilpiruvato, L-fenilalanina, L-tirosina, 2,3-di-hidro-2,3-di-hidroxibenzoato, 2,3-di-hidroxibenzoato, enterobactina, 2-succinil-6-hidróxi-2,4-ciclo-hexadieno-1-carboxilato, o-succinibenzoato, o-succinilbenzoil-coA, 1,4-di-hidróxi-2-naptoato, menaquinona, antranilato, N-(5'-fosforibosil)-antranilato, 1-(o-carboxifenilamino)-1'-desoxirribulose-5'-fosfato, indol-3-glicerol-fosfato, indol, L-triptofano, 4-amino-4-desoxicorismato, para-aminobenzoato, 7,8-di-hidropteroato, 7,8-dihydrofolato, tetra-hydrofolato, 4-hidroxibenzoato, 3-octaprenil-4-hidroxibenzoato, 2-octaprenilfenol, 2,2-octaprenil-6-hidroxifenol, 2-octaprenil-6-metóxi-1,4-benzoquinona, 2-octaprenil-3-metil-6-metóxi-1,4-benzoquinona, 3-demetilubiquinona-8 ou isozimas da ubiquinona-8,3-deóxi-D-arbino-heptulosonato-7-fosfato sintase (DAHPS) ou uma mistura desses.

Algumas modalidades concernem uma composição para aumentar a tolerância à produção de 3-HP por um microorganismo incluindo um vetor que possui um ou mais elementos genéticos capazes de modular a supervia de corismato do microorganismo onde a modulação da supervia de corismato aumenta a tolerância de 3-HP pelo microorganismo. Em outras modalidades, a composição pode incluir intermediários da supervia de corismato. Ainda em outras modalidades, a composição pode incluir um ou mais produtos ou precursores da via.

Os produtos da via podem incluir, porém sem caráter limitativo, um ou mais entre corismato, tirosina, fenilalanina, triptofano, folato, ubiquinona, meniquinona, isozimas da 3-deóxi-D-arbino-heptulosonato-7-fosfato sintase (DAHPS), chiquimato, D-Eritrose-4-fosfato, 3-deóxi-D-arbino-heptulosonato-7-fosfato, 3-desidroquinato, 3-deidro-chiquimato, chiquimato, chiquimato-3-fosfato, 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato, corismato, isocorismato, prefenato, fenilpiruvato, para-hidroxifenilpiruvato, L-fenilalanina, L-tirosina, 2,3-di-hidro-2,3-di-hidroxibenzoato, 2,3-di-hidroxibenzoato, enterobactina, 2-succinil-6-hidróxi-2,4-ciclo-hexadieno-1-carboxilato, o-

succinibenzoato, o- succinilbenzoil-coA, 1,4-di-hidróxi-2-naptoato, menaqui-
 nona, antranilato, N-(5'-fosforibosil)-antranilato, 1-(o-carboxifenilamino)-1'-
 deóxirribulose-5'-fosfato, indol-3-glicerol-fosfato, indol, L-triptofano, 4-amino-
 4-desoxicorismato, para-aminobenzoato, 7,8-di-hidropteroato, 7,8-di-
 5 hidrofolato, tetra-hidrofolato, 4-hidroxibenzoato, 3-octaprenil-4-
 hidroxibenzoato, 2-octaprenilfenol, 2,2-octaprenil-6-hidroxifenol, 2-octaprenil-
 6-metóxiifenol, 2-octaprenil-6-metóxi-1,4-benzoquinona, 2-octaprenil-3-metil-
 6-metóxi-1,4-benzoquinona, 3-demetilubiquinona-8 ou ubiquinona-8.

Outras modalidades incluem composições para aumentar a tole-
 10 rância à produção de ácido 3-hidroxipropiônico (3-HP) por um microorganism-
 o incluindo, porém sem caráter limitativo, um ou mais compostos capazes
 de modular as supervias de corismato do microorganismo onde a indução
 das supervias de corismato aumentam a produção de 3-HP pelo microorga-
 nismo. De acordo com essas modalidades, as composições podem incluir,
 15 porém sem caráter limitativo, um ou mais intermediários, ou composições
 capazes de aumentar e/ou reduzir a produção de um ou mais intermediários
 da supervia de corismato. Outras composições podem incluir um ou mais
 precursores ou composições para aumentar e/ou reduzir a produção de um
 ou mais precursores da supervia de corismato. Algumas modalidades podem
 20 incluir adicionalmente, porém sem caráter limitativo, um ou mais compostos
 selecionados a partir de um ou mais entre corismato, tirosina, fenilalanina,
 triptofano, folato, ubiquinona, meniquinona, chiquimato, D-Eritrose-4-fosfato,
 3-deóxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato, 3-desidroquinato, 3-deidro-
 chiquimato, chiquimato, chiquimato-3-fosfato, 5-enolpiruvil-chiquimato-3-
 25 fosfato, corismato, isocorismato, prefenato, fenilpiruvato, para-
 hidroxifenilpiruvato, L-fenilalanina, L-tirosina, 2,3-di-hidro-2,3-di-
 hidroxibenzoato, 2,3-di-hidroxibenzoato, enterobactina, 2-succinil-6-hidróxi-
 2,4-ciclo-hexadieno-1-carboxilato, o-succinibenzoato, o-succinilbenzoil-coA,
 1,4-di-hidróxi-2-naptoato, menaquinona, antranilato, N-(5'-fosforibosil)-
 30 antranilato, 1-(o-carboxifenilamino)-1'-desoxirribulose-5'-fosfato, indol-3-
 glicerol-fosfato, indol, L-triptofano, 4-amino-4-desoxicorismato, para-
 aminobenzoato, 7,8-di-hidropteroato, 7,8- di-hidro folato, tetra-hidrofolato. 4-

hidroxibenzoato, 3-octaprenil-4-hidroxibenzoato, 2- octaprenilfenol, 2,2-
 octaprenil-6-hidroxifenol, 2-octaprenil-6-metóxfenol, 2- octaprenil-6-metóxi-
 1,4-benzoquinona, 2-octaprenil-3-metil-6-metóxi 1,4-benzoquinona, 3-
 demetilubiquinona-8 ou isozimas da ubiquinona-8,3-deóxi-D-arbino-
 5 heptulosonato-7-fosfato sintase (DAHPS) ou uma mistura desses. Outras
 modalidades podem incluir compostos que induzem uma ou mais enzimas
 da supervia de corismato no microorganismo. Outros compostos exemplifica-
 tivos podem incluir um ou mais vetores capazes de modular a supervia de
 corismato introduzida em um microorganismo de produção de ácido orgâni-
 10 co.

Algumas modalidades incluem composições para modular a tole-
 rância de produção de ácido 3-hidroxipropiônico (3-HP) por um microorga-
 nismo incluindo; um ou mais compostos capazes de modular a supervia de
 corismato pelo microorganismo onde a indução da supervia de corismato
 15 aumenta a produção de 3-HP pelo microorganismo.

Algumas modalidades concernem composições incluindo, porém
 sem caráter limitativo, um ou mais compostos, incluindo, porém sem caráter
 limitativo, corismato, tirosina, fenilalanina, triptofano, folato, ubiquinona, me-
 niquinona, chiquimato, D-Eritrose-4-fosfato, 3-deóxi-D-arabino-
 20 heptulosonato-7-fosfato, 3-desidroquinato, 3-deidro-chiquimato, chiquimato,
 chiquimato-3-fosfato, 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato, corismato, isocoris-
 mato, pefenato, fenilpiruvato, para-hidroxifenilpiruvato, L-fenilalanina, L-
 tirosina, 2,3-di-hidro-2,3-di-hidroxibenzoato, 2,3-di-hidroxibenzoato, entero-
 bactina, 2-succinil-6-hidróxi-2,4-ciclo-hexadieno-1-carboxilato, o-
 25 succinibenzoato, o-succinilbenzoil-coA, 1,4- di-hidróxi-2-naptoato, menaqui-
 nona, antranilato, N-(5'-fosforibosil)-antranilato, 1-(o-carboxifenilamino)-r-
 desoxirribulose-5'-fosfato, indol-3-glicerol-fosfato, indol, L-triptofano, 4-
 amino-4-desoxicorismato, para-aminobenzoato, 7,8-di-hidropteroato, 7,8-di-
 hidrofolato, tetra-hidrofolato, 4-hidroxibenzoato, 3-octaprenil-4-
 30 hidroxibenzoato, 2-octaprenilfenol, 2,2-octaprenil-6-hidroxifenol, 2-octaprenil-
 6-metóxfenol, 2-octaprenil-6-metóxi-1,4-benzoquinona, 2-octaprenil-3-metil-
 6-metóxi 1,4-benzoquinona, 3-demetilubiquinona-8 ou isozimas da ubiquino-

na-8,3-deóxi-D-arbino-heptulosonato-7-fosfato sintase (DAHPS) ou uma mistura desses.

Outras modalidades incluem métodos para aumentar a tolerância de produção de um ácido orgânico por um microorganismo incluindo, porém sem caráter limitativo, inibir repressores capazes de afetar a supervia de corismato no microorganismo. De acordo com essas modalidades, outros compostos capazes de aumentar a produção ou tolerância a ácidos orgânicos ou álcool podem ser combinados ou adicionados separadamente a qualquer cultura contemplada aqui. Ademais, contempla-se aqui que os métodos e composições descritos podem ser usados em combinação com outras tecnologias de produção de 3-HP conhecidas na técnica.

De acordo com qualquer uma dessas modalidades, um ou mais compostos e/ou composições podem ser introduzidos em um microorganismo onde o composto e/ou composição é capaz de modular a supervia de corismato e aumentar a tolerância do microorganismo à produção de 3-HP. Ademais, contempla-se aqui que os métodos e composições podem ser combinados com qualquer outro método conhecido para aumentar a tolerância ou produção de um ácido orgânico em um microorganismo.

Algumas modalidades podem incluir métodos para aumentar a produção e/ou tolerância à produção de um ácido orgânico por um microorganismo compreendendo: a) obter um ou mais compostos capazes de modular aspectos de supervia de corismato pelo microorganismo. Em algumas modalidades, a modulação das supervias de corismato aumenta a tolerância à produção de 3-HP pelo microorganismo; e b) introduzir os compostos em uma cultura do microorganismo.

Algumas modalidades concernem a produção ou tolerância aumentada ao ácido orgânico, 3-HP. De acordo com essas modalidades, um ou mais compostos contemplados aqui para aumentar a tolerância ou produção de 3-HP podem incluir, porém sem caráter limitativo, a composição compreende um ou mais intermediários da supervia de corismato selecionados entre D-Eritrose-4-fosfato, 3-deóxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato, 3-desidroquinato, 3-deidro-chiquimato, chiquimato, chiquimato-3-fosfato. 5-

enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato, corismato, isocorismato, prefenato, fenilpiruvato, para-hidroxifenilpiruvato, L-fenilalanina, L-tirosina, 2,3-di-hidro-2,3-dihidroxibenzoato, 2,3-dihidroxibenzoato, enterobactina, 2-succinil-6-hidróxi-2,4-ciclo-hexadieno-1-carboxilato, o-succinibenzoato, o-succinilbenzoil-coA, 5 1,4-di-hidróxi-2-naptoato, menaquinona, antranilato, N-(5'-fosforibosil)-antranilato, 1-(o-carboxifenilamino)-1'-desoxirribulose-5'-fosfato, indol-3-glicerol-fosfato, indol, L-triptofano, 4-amino-4-desoxicorismato, para-aminobenzoato, 7,8-di-hidropteroato, 7,8-di-hidrofolato, tetra-hidrofolato, 4-hidroxibenzoato, 3-octaprenil-4-hidroxibenzoato, 2-octaprenilfenol, 2,2-10 octaprenil-6-hidroxifenol, 2-octaprenil-6-metóxiifenol, 2-octaprenil-6-metóxi-1,4-benzoquinona, 2-octaprenil-3-metil-6-metóxi 1,4-benzoquinona, 3-demetilubiquinona-8, ubiquinona-8 e uma combinação ou mistura de dois ou mais desses.

Ainda outras modalidades incluem métodos para aumentar a 15 produção de um ácido orgânico, tal como ácido 3-hidroxiopropiônico (3-HP), por um microorganismo compreendendo colocar uma cultura de microorganismos em contato com uma composição compreendendo um ou mais compostos de supervias de corismato e/ou um ou mais compostos capazes de modular as supervias de corismato. De acordo com essas modalidades, um 20 ou mais compostos podem incluir um vetor possuindo um ou mais elementos genéticos capazes de modular, tal como, aumentar ou reduzir a supervia de corismato. Algumas modalidades contempladas aqui referem-se ao uso de outros compostos, esses compostos podem incluir um vetor possuindo um ou mais elementos genéticos capazes de aumentar os componentes a ju- 25 sante da supervia de corismato para aumentar tolerância a 3-HP em um microorganismo.

Em algumas modalidades, os métodos para aumentar a produ- 30 ção e/ou tolerância de ácido 3-hidroxiopropiônico (3-HP) por um microorganismo podem incluir, porém sem caráter limitativo, supervias de corismato de manipulação genética no microorganismo. Algumas dessas manipulações genéticas da supervia de corismato em um microorganismo são selecionadas a partir da modulação da supervia de corismato em um microorganismo

adicionando-se um vetor para introduzir novo material genético; inserção genética, divisão ou remoção de material genético existente; mutação de material genético e uma combinação desses. As manipulações genéticas podem incluir a indução de um ou mais entre precursor de supervia de corismato, corismato, tirosina, fenilalanina, triptofano, folato, ubiquinona, meniquinona, isozimas da 3-deóxi-D-arbino-heptulosonato-7-fosfato sintase (DAHPS), chiquimato ou uma mistura desses.

Algumas modalidades podem ser combinadas com outros métodos ou composições conhecidas na técnica para aumentar a tolerância à produção de ácido orgânico em um microorganismo. Em outras modalidades, os métodos e composições podem ser combinados com processos de seleção de cepa para identificar as cepas capazes de produzir e/ou tolerar concentrações aumentadas de 3-HP. Por exemplo, como referido aqui, Análises Multiescala de Enriquecimentos de Biblioteca (SCALEs) podem ser usadas para identificar genes conferindo adaptação aumentada em seleções de fluxo contínuo. Essas seleções podem se basear na presença ou ausência de um composto seletivo, tal como, um ou mais ácidos orgânicos ou álcoois de interesse. Algumas modalidades concernem a seleção com aumento de ácido orgânico, por exemplo, ácido 3-hidroxi propiônico (3-HP) em níveis inibidores. Esses processos de seleção podem se basear em SCALEs separadamente ou em combinação com outras tecnologias de seleção, por exemplo, outras tecnologias genômicas.

Em algumas modalidades, os kits são contemplados aqui. Em algumas modalidades, um kit para aumentar a produção de um ácido orgânico em um microorganismo pode incluir, porém sem caráter limitativo, um ou mais compostos capazes de modular a supervia de corismato; e um ou mais recipientes. De acordo com essas modalidades, um kit que pode incluir um ou mais compostos é selecionado a partir de corismato, tirosina, fenilalanina, triptofano, folato, ubiquinona, meniquinona, isozimas da 3-deóxi-D-arbino-heptulosonato-7-fosfato sintase (DAHPS), chiquimato, precursor da supervia de corismato, uma ou mais enzimas da supervia de corismato D-Eritrose-4-fosfato, 3-deóxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato, 3-

desidroquinato, 3-deidro-chiquimato, chiquimato, chiquimato-3-fosfato, 5 - enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato, corismato, isocorismato, prefenato, fenilpiruvato, para-hidroxifenilpiruvato, L-fenilalanina, L-tirosina, 2,3- di-hidro-2,3-dihidroxibenzoato, 2,3-dihidroxibenzoato, enterobactina, 2-succinil-6-hidróxi-
 5 2,4-ciclo-hexadieno-1-carboxilato, o-succinibenzoato, o-succinilbenzoil-coA, 1,4-di-hidróxi-2-naptoato, menaquinona, antranilato, N-(5'-fosforibosil)-antranilato, 1-(o-carboxifenilamino)-1'-desoxirribulose-5'-fosfato, indol-3-glicerol-fosfato, indol, L-triptofano, 4-amino-4-desoxicorismato, para-aminobenzoato, 7,8-di-hidropteroato, 7,8-di-hidrofolato, tetra-hidrofolato, 4-
 10 hidroxibenzoato, 3-octaprenil-4-hidroxibenzoato, 2- octaprenilfenol, 2,2-octaprenil-6-hidroxifenol, 2-octaprenil-6-metóxifenol, 2-octaprenil-6-metóxi-1,4-benzoquinona, 2-octaprenil-3-metil-6-metóxi 1,4-benzoquinona, 3-demetilubiquinona-8, ubiquinona-8 e uma combinação ou mistura de dois ou mais desses.

15 Em algumas modalidades, um kit para aumentar a produção de um ácido orgânico em um microorganismo pode incluir, porém sem caráter limitativo, um ou mais compostos capazes de modular a supervia de corismato onde a modulação envolve níveis intracelulares de um ou mais intermediários da supervia de corismato selecionados partir de D-Eritrose-4-
 20 fosfato, 3 -deóxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato, 3-desidroquinato, 3-deidro-chiquimato, chiquimato, chiquimato-3-fosfato, 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato, corismato, isocorismato, prefenato, fenilpiruvato, para-hidroxifenilpiruvato, L-fenilalanina, L-tirosina, 2,3-di-hidro-2,3-dihidroxibenzoato, 2,3-dihidroxibenzoato, enterobactina, 2- succinil-6-hidróxi-
 25 2,4-ciclo-hexadieno-1-carboxilato, o-succinibenzoato, o-succinilbenzoil-coA, 1,4-di-hidróxi-2-naptoato, menaquinona, antranilato, N-(5'-fosforibosil)-antranilato, 1-(o-carboxifenilamino)-1'-desoxirribulose-5'-fosfato, indol-3-glicerol-fosfato, indol, L-triptofano, 4-amino-4-desoxicorismato, para-aminobenzoato, 7,8-di-hidropteroato, 7,8-di-hidrofolato, tetra-hidrofolato, 4-
 30 hidroxibenzoato, 3-octaprenil-4-hidroxibenzoato, 2-octaprenilfenol, 2,2-octaprenil-6-hidroxifenol, 2- octaprenil-6-metóxifenol, 2-octaprenil-6-metóxi-1,4-benzoquinona. 2-octaprenil-3-metil-6-metóxi-1,4-benzoquinona, 3-

demetilubiquinona-8, ubiquinona-8 e uma combinação ou mistura de dois ou mais desses.

Os versados na técnica irão perceber que embora os métodos e composições sejam descritos em termos de modalidades para a aplicação de tolerância aumentada à produção de 3-HP em microorganismos, esses também podem ser úteis com outros tipos de tolerância a ácidos orgânicos em microorganismos.

DESCRIÇÃO DE MODALIDADES ILUSTRATIVAS

Os seguintes desenhos formam parte do presente relatório descritivo e são incluídos para ilustrar adicionalmente algumas modalidades. As modalidades podem ser melhor entendidas a título de referência a um ou mais desses desenhos em combinação com a descrição detalhada de modalidades específicas apresentadas aqui.

As Figuras 1A-1D representam esquemas de análise multiescala ampla de genoma a partir da seleção de 3-HP. A) representa o sinal associado à escala de 1000 (bp) de par de bases; B) representa o sinal associado à escala de 2000 bp, C) representa o sinal associado à escala de 4000 bp e D) representa o sinal associado à escala maior que 8000 bp.

A Figura 2A representa um gráfico histograma exemplificativo de sete vias que contribuem para a adaptação na presença de 3-HP.

A Figura 3 A representa um esquema exemplificativo de uma supervia de corismato.

A Figura 3B representa um gráfico de barras exemplificativo da alteração na adaptação (aumento na taxa de crescimento) associada ao aumento no número de cópias dos genes associados à supervia de corismato, como designado.

A Figura 4 representa um gráfico de barras exemplificativo do crescimento de microorganismos na presença ou ausência de moléculas orgânicas adicionadas de maneira exógena ou combinações de moléculas.

30 Definições

Como usado aqui, "um" ou "uma" pode significar um ou mais de um item.

Como usado aqui, "modular" ou "modulando" ou "modulação" pode significar alterar, aumentar ou reduzir.

DESCRIÇÃO DETALHADA

Nas seguintes seções, várias composições e métodos exemplificativos são descritos para detalhar diversas modalidades da invenção. Se 5 tornar-se óbvio para um versado na técnica que praticar as várias modalidades não requer o emprego de todos ou mesmo alguns detalhes específicos descritos aqui, porém, especialmente aquelas concentrações, tempos, temperatura e outros detalhes específicos podem ser modificadas através de experimentação 10 rotineira. Em alguns casos, os métodos ou componentes bem conhecidos não foram incluídos na descrição.

De acordo com as presentes modalidades, pode-se empregar biologia molecular convencional, microbiologia e técnicas de DNA recombinante dentro da habilidade do elemento versado na técnica. Tais técnicas 15 são explicadas de forma geral na literatura. (Veja, por exemplo, Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition* 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; *Animal Cell Culture*, R. I. Freshney, ed., 1986).

Biorrefinação envolve o desenvolvimento de processos eficazes 20 para a conversão de fontes renováveis de carbono e energia em produtos químicos de base de grande volume. O Departamento de Energia dos Estados Unidos (USDOE) publicou uma lista de prioridade de produtos químicos de bloco de construção para tentativas futuras de biorrefinação, essa inclui, por exemplo, ácido 3-hidroxi-propiónico (3-HP). A produção anterior foi realizada 25 através do desenvolvimento de hospedeiros recombinantes que convertem glicose em 3-HP. Foi proposto que titragens finais de 3-HP de pelo menos 100 g/L são necessárias para garantir a viabilidade econômica para produção industrial, porém, com 10 g/L nessas culturas pode-se inibir o crescimento.

30 Diversas estratégias genéticas diferentes foram investigadas para a produção de 3-HP em *E. coli*, esse é um organismo hospedeiro atraente devido a sua ampla faixa de fonte de nutrientes {por exemplo, pento-

ses), crescimento rápido e capacidade de ser fácil e geneticamente modificado quando comparado com organismos alternativos. Um problema foi a baixa tolerância à produção em larga escala de compostos orgânicos por um microorganismo. Geralmente, o teor de composto orgânico aumentado se torna tóxico ao microorganismo. Há a necessidade de aumentar a produção e tolerância à produção de ácido orgânico e álcool por microorganismos.

A Análise Escalar de Enriquecimento de Biblioteca (SCALEs), é uma abordagem ampla genômica de alta resolução que pode ser usada para monitorar o enriquecimento e diluição de clones individuais dentro de uma população de biblioteca genômica. Esse método inclui a criação de bibliotecas genômicas representativas com tamanho de inserto variado, crescimento de clones em ambientes seletivos, interrogação da população selecionada utilizando microarranjos e uma análise multiescala matemática para identificar o(s) gene(s) para tal número de cópias aumentado melhorar a adaptação total. Esse método foi empregado para desenvolver a técnica de seleção de cepa dirigida referente a fenótipos de ácido orgânico, por exemplo, fenótipos de tolerância a 3-HP (dados não mostrados). O trabalho anterior identificou diversos mecanismos para aliviar a toxicidade do produto incluindo: formação de biofilme, permeabilidade alterada, transporte aumentado, modificação de produto ou utilização de carbono e alterações metabólicas específicas. Em algumas modalidades, os métodos procuram avaliar a inibição devido aos efeitos metabólicos específicos do estresse por ácido orgânico, por exemplo, estresse por 3-HP, dentro da célula relacionada à via biossintética de corismato.

Algumas modalidades concernem biorrefinação, biomassa (por exemplo, culturas, árvores, granas, resíduos culturais, resíduos florestais) e utilizam conversão biológica, fermentação, conversão química e catálise para gerar e usar compostos orgânicos. Esses compostos orgânicos podem ser então subsequentemente convertidos em produtos químicos derivados valiosos. Entretanto, os ácidos orgânicos podem ser tóxicos por natureza e, desse modo, inibidores dos organismos de produção em baixos níveis. Para otimizar a produção dos intermediários de ácido orgânico, a tolerância elabo-

rada ao ácido orgânico pode ser um fator. Isso pode ser realizado ao fornecer moléculas exógenas para aumentar a produção ou inibir a expressão de uma molécula não-permissiva permitindo, assim, níveis aumentados de produção. Uma vez que há produtos químicos de base em um ambiente competitivo, a otimização pode ser necessária para viabilidade econômica de biorrefinação. Portanto, as composições e métodos descritas aqui referem-se à identificação de cepas bacterianas e regiões genéticas dentro de moléculas que aumentam a produção ou tolerância aos compostos orgânicos para uso em produtos de bioprodução e sistemas.

10 Supervia de corismato

A supervia de corismato é uma via metabólica primária essencial para a viabilidade celular. Por exemplo, o corismato é o precursor comum a inúmeros aminoácidos aromáticos (tirosina, fenilalanina, triptofano) e vitaminas (folato, ubiquinona e meniquinona) exigidos para viabilidade celular. Em um exemplo mais particular, as isozimas da 3-deóxi-D-arbino-heptulosonato-7-fosfato sintase (DAHPS) ativas na primeira etapa da síntese de corismato (aroF, aroG, aroH) mostram retroinibição significativa de grupos de aminoácidos aromáticos produzidos a jusante. Em uma modalidade, a supervia de corismato pode ser inibida pelo estresse por 3-HP, que pode ser parcialmente aliviado pela adição de um produto a jusante da supervia de corismato ao meio de crescimento. Em uma modalidade mais particular, o produto a jusante pode ser chiquimato. A adição de cada produto a jusante de corismato mostra uma regeneração pelo menos parcial de crescimento específico e densidade celular final. Em uma modalidade particular, a adição de chiquimato podem resultar em uma regeneração de cerca de 20% de crescimento comparado com o crescimento de ocorrência natural, indicando que a inibição pode ocorrer antes da formação de chiquimato, resultando em um grupo de aminoácidos e vitaminas reduzido dentro da célula.

Em várias modalidades, o crescimento pode ser aumentado ao identificar um gene que, com expressão modulada, pode aumentar a tolerância e/ou produção de um composto orgânico. Em algumas modalidades, a modulação pode incluir um aumento na expressão ou atividade de um ou

mais genes da supervia de corismato. Em outras modalidades, a modulação pode incluir uma redução na expressão ou atividade de um ou mais genes da supervia de corismato. Em outras modalidades, a modulação da supervia de corismato pode incluir uma combinação de aumento da expressão e/ou
5 atividade de alguns genes ao mesmo tempo em que reduz a expressão e/ou atividade de outros genes. Em algumas modalidades, os genes capazes de alterar a supervia de corismato podem incluir genes que alteram a formação de um intermediário da via e/ou alteram os precursores da via. Contempla-se aqui que a manipulação genética pode incluir, aumentar e/ou reduzir o fluxo
10 de intermediários através da supervia de corismato.

As seleções genéticas usadas para detectar compostos individuais geralmente procedem com uma célula de cada vez. As seleções estão relacionadas à viabilidade em um ambiente específico. Portanto, em uma modalidade, os organismos bacterianos que demonstram crescimento ou
15 tolerância aumentada a um ácido orgânico podem ser selecionados e a região genética que afeta o crescimento, produção e/ou tolerância identificada. Em algumas modalidades, a seleção de uma região genética que codifica tirosina demonstrou produção aumentada e/ou tolerância de uma molécula de ácido orgânico produzida em uma bactéria.

20 Algumas modalidades concernem modular a supervia de corismato capaz de aumentar a tolerância de produção do composto orgânico em um microorganismo. De acordo com essas modalidades, a expressão de algumas moléculas dentro dessa via é capaz de aumentar a tolerância de um composto orgânico ao modular a expressão de genes da via. Essa nova
25 estratégia de tolerância irá permitir a produção aumentada de compostos orgânicos, tal como, 3-HP. Por exemplo, as cepas já elaboradas para produzir 3-HP podem ser modificadas ao modular um ou mais genes na supervia de corismato descritos aqui para aumentar a tolerância da cepa de modo a produzir 3-HP. Ademais, esses métodos podem ser usados em conjunto
30 com a tecnologia SCALEs (Pedido Provisório número U.S. 60/611.377 depositado em 20 de setembro de 2004 e Pedido de Patente No. US 11/231.018 depositado em 20 de setembro de 2005, ambos intitulados: "Mixed-Library

Parallel Gene Mapping Quantitation Microarray Technique for Genome Wide Identification of Trait Conferring Genes" aqui incorporados a título de referência em sua totalidade), para alterações genéticas de organismos e para estratégias de seleção genética.

5 Em algumas modalidades, a manipulação genética de microorganismos pode ser usada para realizar alterações genéticas desejadas podendo resultar em fenótipos desejados e pode ser realizada através de inúmeras técnicas. Essas técnicas incluem, porém sem caráter limitativo, utilizar: i) um vetor para introduzir o novo material genético; ii) inserção genética, 10 divisão ou remoção de material genético existente, bem como; iii) mutação de material genético; ou quaisquer combinações de i, ii e iii, resultando em alterações genéticas desejadas com busca fenotípica desejada. Um vetor pode incluir, porém sem caráter limitativo, qualquer elemento genético usado para introduzir o novo material genético em um organismo. Esses vetores 15 podem incluir, porém sem caráter limitativo, um plasmídeo de qualquer número de cópias, um elemento integrável que integra qualquer cópia no genoma, um vírus, fago ou fagomídeo. Em outras modalidades, inserções genéticas, divisões ou remoções podem ser incluídas como parte da inserção de um novo elemento genético no genoma, transcrição por divisão ou função 20 reguladora normal através da inserção podendo afetar grandes regiões do genoma além daquelas no sítio de inserção e a deleção ou remoção de uma região do genoma. Esses podem ser realizados com técnicas que incluem, porém sem caráter limitativo, nocautes ou mutações dirigidas, substituições genéticas, transposons, mutagênese aleatória ou uma combinação desses. 25 As mutações podem ser dirigidas ou aleatórias, utilizando quaisquer técnicas que exigem vetores, inserções, divisões ou remoções, além daquelas que incluem, porém sem caráter limitativo, mutagênese propensa a erros ou dirigida através de PCR, cepas de mutantes e metagênese aleatória, mediante qualquer técnica conhecida.

30 Em algumas modalidades, SCALEs pode ser usada para monitorar o enriquecimento e diluição de clones individuais dentro de uma população de biblioteca genômica. Esse método inclui a criação de bibliotecas ge-

nômicas representativas com tamanho de inserto variado, crescimento de clones em ambientes seletivos, interrogação da população selecionada utilizando microarranjos e uma análise multiescala matemática para identificar o(s) gene(s) para que o número de cópias aumentado melhore a adaptação total.

Ademais, algumas modalidades contempladas aqui referem-se à inibição da expressão ou atividade de um gene repressor correspondente a um gene intensificador (por exemplo, um gene que aumenta a produção ou aumenta a tolerância à produção de um ácido orgânico por um microorganismo). Em outras modalidades, os clones que conduzem uma deleção na região TyrR (região de gene repressor da tirosina), a região repressora correspondente à vias de Tirosina e Corismato, pode ser usada para aumentar os grupos tirosina. A combinação desse repressor com outras mutações de via de corismato poderia resultar na alteração de grupos intermediários relacionados à produção de chiquimato aumentada e tolerância aumentada a 3-HP correspondente. Em algumas modalidades, uma região genética equivalente, correspondente ou incluindo cerca de 50% ou cerca de 60% ou cerca de 70% ou ainda cerca de 80% ou cerca de 90% da região de gene com variação de 2736799-2738100 (clone da Tirosina A) em culturas MACH1 e/ou região de gene com variação de 2736700-2739223 (clone da Tirosina A) pode ser usada aqui para aumentar a produção ou tolerância à produção de 3-HP por um microorganismo. Ademais, contempla-se aqui que uma mutação/deleção dentro de uma região genética, correspondente ou incluindo cerca de 50 %, cerca de 60%, cerca de 70%, cerca de 80% ou cerca de 90% da região de gene com variação de 1384744-1386285 (clone da Tirosina R) pode ser usada aqui para aumentar a produção ou tolerância à produção de 3-HP por um microorganismo. Em uma modalidade, um ou mais mutações/deleções podem estar dentro de uma região genética que codifica um repressor capaz de reprimir qualquer aminoácido produzido na supervia de corismato, por exemplo, tirosina. Nota: a porcentagem contemplada aqui pode incluir regiões não-contíguas.

Em um método exemplificativo, a análise de adaptação de via

identificou múltiplas vias, cada uma exercendo uma função na inibição de crescimento específica em níveis aumentados de 3-HP, inclusive a supervia de corismato e a supervia de biossíntese de histidina, purina e pirimidina (PRPP) (veja, por exemplo, Figura 2). Essa metodologia quantitativa ampla
 5 genômica permitiu a identificação de vias metabólicas totais associada à inibição do crescimento devido ao estresse por 3-HP.

Algumas modalidades concernem composições para aumentar a tolerância ao ácido 3-hidroxi-propiônico (3-HP) por um microorganismo que compreende; um ou mais compostos capazes de modular a supervia de co-
 10 rismato do microorganismo onde a modulação da supervia de corismato aumenta a tolerância de 3-HP. Em algumas modalidades, a composição inclui um intermediário da supervia de corismato. Em outras modalidades, a composição inclui um precursor para a supervia de corismato. Ainda em outras modalidades, a composição inclui modular o fluxo da supervia de corismato.
 15 Em algumas modalidades, modular pode significar aumentar ou reduzir a expressão ou atividade de um ou mais genes da supervia de corismato. De acordo com essas modalidades, um ou mais compostos podem induzir uma enzima da supervia de corismato no microorganismo. Em outras modalidades, o composto pode incluir um vetor que possui um elemento genético ca-
 20 paz de modular a supervia de corismato.

As composições e métodos de uso contemplados aqui podem incluir, porém sem caráter limitativo, um ou mais intermediários da supervia de corismato selecionados a partir de D-Eritrose-4-fosfato, 3-deóxi-D-arabino-heptulose-7-fosfato, 3-desidroquinato, 3-deidro-chiquimato, chi-
 25 quimato, chiquimato-3-fosfato, 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato, corismato, isocorismato, prefenato, fenilpiruvato, para-hidroxifenilpiruvato, L-fenilalanina, L-tirosina, 2,3-di-hidro-2,3-di-hidroxibenzoato, 2,3-di-hidroxibenzoato, enterobactina, 2-succinil-6-hidróxi-2,4-ciclo-hexadieno-1-carboxilato, o-succinibenzoato, o-succinilbenzoil-coA, 1,4-di-hidróxi-2-
 30 naphato, menaquinona, antranilato, N-(5'-fosforibosil)-antranilato, 1-(o-carboxifenilamino)-1'-desoxirribulose-5'-fosfato, indol-3-glicerol-fosfato, indol, L-triptofano, 4-amino-4-desoxicorismato, para-aminobenzoato, 7,8-di-

hidropteroato, 7,8-di-hidrofolato, tetra-hidrofolato, 4-hidroxibenzoato, 3-octaprenil-4-hidroxibenzoato, 2-octaprenilfenol, 2,2-octaprenil-6-hidroxifenol, 2-octaprenil-6-metóxfenol, 2-octaprenil-6-metóxi-1,4-benzoquinona, 2-octaprenil-3-metil-6-metóxi-1,4-benzoquinona, 3-demetilubiquinona-8, ubi-
 5 quinona-8 ou uma combinação ou mistura de dois ou mais desses.

As composições e métodos de uso contemplados aqui podem incluir, porém sem caráter limitativo, um ou mais precursores da supervia de corismato selecionados a partir de D-Eritrose-4-fosfato, 3-deóxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato, 3-desidroquinato, 3-deidro-chiquimato, chiquimato,
 10 chiquimato-3-fosfato, 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato, corismato, isocorismato, prefenato, fenilpiruvato, para-hidroxifenilpiruvato, L-fenilalanina, L-tirosina, 2,3-di-hidro-2,3-di-hidroxibenzoato, 2,3-di-hidroxibenzoato, enterobactina, 2-succinil-6-hidróxi-2,4-ciclo-hexadieno-1-carboxilato, o-succinibenzoato, o-succinilbenzoil-coA, 1,4-di-hidróxi-2-naptoato, menaqui-
 15 nona, antranilato, N-(5'-fosforibosil)-antranilato, 1-(o-carboxifenilamino)-1'-desoxirribulose-5'-fosfato, indol-3-glicerol-fosfato, indol, L-triptofano, 4-amino-4-desoxicorismato, para-aminobenzoato, 7,8-di-hidropteroato, 7,8-di-hidrofolato, tetra-hidrofolato, 4-hidroxibenzoato, 3-octaprenil-4-hidroxibenzoato, 2-octaprenilfenol, 2,2-octaprenil-6-hidroxifenol, 2-octaprenil-
 20 6-metóxfenol, 2-octaprenil-6-metóxi-1,4-benzoquinona, 2-octaprenil-3-metil-6-metóxi-1,4-benzoquinona, 3-demetilubiquinona-8, ubiquinona-8 e uma combinação, ou mistura de dois ou mais desses.

As composições e métodos de uso contemplados aqui podem incluir, porém sem caráter limitativo, uma ou mais composições que são ca-
 25 pazes de alterar os níveis intracelulares de um ou mais intermediários da supervia de corismato selecionados a partir de D-Eritrose-4-fosfato, 3-deóxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato, 3-desidroquinato, 3-desidro-chiquimato, chiquimato, chiquimato-3-fosfato, 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato, corismato, isocorismato, prefenato, fenilpiruvato, para-hidroxifenilpiruvato, L-
 30 fenilalanina, L-tirosina, 2,3-di-hidro-2,3-di-hidroxibenzoato, 2,3-di-hidroxibenzoato, enterobactina, 2-succinil-6-hidróxi-2,4-ciclo-hexadieno-1-carboxilato, o-succinibenzoato, o-succinilbenzoil-coA, 1,4-di-hidróxi-2-

naptoato, menaquinona, antranilato, N-(5'-fosforibosil)-antranilato, 1-(o-carboxifenilamino)-1'-desoxirribulose-5'-fosfato, indol-3-glicerol-fosfato, indol, L-triptofano, 4-amino-4-desoxicorismato, para-aminobenzoato, 7,8-dihidropteroato, 7,8-dihidrofolato, tetra-hidrofolato, 4-hidroxibenzoato, 3-octaprenil-4-hidroxibenzoato, 2-octaprenilfenol, 2,2-octaprenil-6-hidroxifenol, 2-octaprenil-6-metóxiifenol, 2-octaprenil-6-metóxi-1,4-benzoquinona, 2-octaprenil-3-metil-6-metóxi-1,4-benzoquinona, 3-demetilubiquinona-8, ubiquinona-8 e uma combinação ou mistura de dois ou mais desses.

As composições e métodos de uso contemplados aqui podem incluir, porém sem caráter limitativo, uma ou mais composições capazes de alterar os níveis intracelulares de um ou mais precursores da supervia de corismato selecionados a partir de D-Eritrose-4-fosfato, 3-deóxi-D-arabinoheptulosonato-7-fosfato, 3-desidroquinato, 3-desidro-chiquimato, chiquimato, chiquimato-3-fosfato, 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato, corismato, isocorismato, prefenato, fenilpiruvato, para-hidroxifenilpiruvato, L-fenilalanina, L-tirosina, 2,3-di-hidro-2,3-di-hidroxibenzoato, 2,3-di-hidroxibenzoato, enterobactina, 2-succinil-6-hidróxi-2,4-ciclo-hexadieno-1-carboxilato, o-succinibenzoato, o-succinilbenzoil-coA, 1,4-di-hidróxi-2-naptoato, menaquinona, antranilato, N-(5'-fosforibosil)-antranilato, 1-(o-carboxifenilamino)-1'-desoxirribulose-5'-fosfato, indol-3-glicerol-fosfato, indol, L-triptofano, 4-amino-4-desoxicorismato, para-aminobenzoato, 7,8-dihidropteroato, 7,8-dihidrofolato, tetra-hidrofolato, 4-hidroxibenzoato, 3-octaprenil-4-hidroxibenzoato, 2-octaprenilfenol, 2,2-octaprenil-6-hidroxifenol, 2-octaprenil-6-metóxiifenol, 2-octaprenil-6-metóxi-1,4-benzoquinona, 2-octaprenil-3-metil-6-metóxi 1,4-benzoquinona, 3-demetilubiquinona-8, ubiquinona-8 e uma combinação ou mistura de dois ou mais desses.

As composições e métodos de uso contemplados aqui podem incluir, porém sem caráter limitativo, um ou mais compostos selecionados a partir de corismato, tirosina, fenilalanina, triptofano, folato, ubiquinona, meniquinona, isozimas da 3-deóxi-D-arabinoheptulosonato-7-fosfato sintase (DAHPS), chiquimato, D-Eritrose-4-fosfato, 3-deóxi-D-arabinoheptulosonato-7-fosfato, 3-desidroquinato, 3-desidro-chiquimato, chiquimato.

chiquimato-3-fosfato, 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato, corismato, isocorismato, pefenato, fenilpiruvato, para-hidroxifenilpiruvato, L-fenilalanina, L-tirosina, 2,3-di-hidro-2,3-di-hidroxibenzoato, 2,3-di-hidroxibenzoato, enterobactina, 2-succinil-6-hidróxi-2,4-ciclo-hexadieno-1-carboxilato, o-succinibenzoato, o-succinilbenzoil-coA, 1,4-di-hidróxi-2-naptoato, menaquinona, antranilato, N-(5'-fosforibosil)-antranilato, 1-(o-carboxifenilamino)-1'-desoxirribulose-5'-fosfato, indol-3-glicerol-fosfato, indol, L-triptofano, 4-amino-4-desoxicorismato, para-aminobenzoato, 7,8-di-hidropteroato, 7,8-dihidro folato, tetra-hidrofolato, 4-hidroxibenzoato, 3-octaprenil-4-hidroxibenzoato, 2-octaprenilfenol, 2,2-octaprenil-6-hidroxifenol, 2-octaprenil-6-metóxi-1,4-benzoquinona, 2-octaprenil-3-metil-6-metóxi 1,4-benzoquinona, 3-demetilubiquinona-8 ou ubiquinona-8.

Em algumas modalidades, as composições e métodos de uso aqui podem concernir o uso de um composto que modula uma ou mais enzimas da supervia de corismato no microorganismo. Em algumas modalidades, as composições e método de uso aqui podem concernir o uso de um composto que modula um ou mais compostos ao introduzir um ou mais vetores tendo elemento(s) genético(s) capaz(es) de alterar os metabólitos da supervia de corismato. Em algumas modalidades, as composições e métodos de uso aqui podem concernir um ou mais compostos capazes de modular uma alteração genética que altera os metabólitos na supervia de corismato.

Outras modalidades concernem as composições ou métodos de uso para aumentar a produção de ácido 3-hidroxi-3-piruvato (3-HP) por um microorganismo utilizando um ou mais compostos capazes de aumentar a tolerância do microorganismo ao 3-HP, onde a composição induz a tolerância a pelo menos 30g/L de 3-HP. Outras modalidades contempladas incluem a tolerância a pelo menos 35 g/L de 3-HP; a pelo menos 40g/L 3-HP; a pelo menos 1,2 vez o 3-HP de uma composição de ocorrência natural, a pelo menos 1,4 vez o 3-HP de uma composição de ocorrência natural; a pelo menos 1,6 vez o 3-HP de uma composição de ocorrência natural, onde a composição de ocorrência natural possui pouca ou nenhuma supervia de corismato alterando as composições ou métodos.

Outros métodos exemplificativos contemplados aqui concernem em aumentar a produção ou tolerância à produção de um ácido orgânico por um microorganismo compreendendo, modular a supervia de corismato no microorganismo. De acordo com esses métodos exemplificativos, modular a supervia de corismato no microorganismo pode incluir introduzir um composto no microorganismo capaz de modular a supervia de corismato. Outros métodos contemplados para aumentar a produção ou tolerância à produção de um ácido orgânico por um microorganismo podem incluir: obter um ou mais compostos capazes de modular intermediários das supervias de corismato pelo microorganismo, onde a modulação das supervias de corismato aumenta a produção ou tolerância ao ácido orgânico pelo microorganismo; e introduzir os compostos em uma cultura do microorganismo. Em algumas modalidades mais particulares o ácido orgânico é 3-HP ou uma composição de 3-HP.

Em algumas modalidades, os compostos podem ser selecionados a partir de um ou mais entre corismato, tirosina, fenilalanina, triptofano, folato, ubiquinona, meniquinona, isozimas da 3-deóxi-D-arbinoheptulose-7-fosfato sintase (DAHPS), chiquimato, D-Eritrose-4-fosfato, 3-deóxi-D-arabinoheptulose-7-fosfato, 3-desidroquinato, 3-desidrochiquimato, chiquimato, chiquimato-3-fosfato, 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato, corismato, isocorismato, prefenato, fenilpiruvato, parahidroxifenilpiruvato, L-fenilalanina, L-tirosina, 2,3-di-hidro-2,3-di-hidroxibenzoato, 2,3-di-hidroxibenzoato, enterobactina, 2-succinil-6-hidróxi-2,4-ciclo-hexadieno-1-carboxilato, o-succinilbenzoato, o-succinilbenzoil-coA, 1,4-di-hidróxi-2-naftoato, menaquinona, antranilato, N-(5'-fosforibosil)-antranilato, 1-(o-carboxifenilamino)-1'-desoxirribulose-5'-fosfato, indol-3-glicerol-fosfato, indol, L-triptofano, 4-amino-4-desoxicorismato, paraaminobenzoato, 7,8-di-hidropteroato, 7,8-di-hidrofolato, tetra-hidrofolato, 4-hidroxibenzoato, 3-octaprenil-4-hidroxibenzoato, 2-octaprenilfenol, 2,2-octaprenil-6-hidroxifenol, 2-octaprenil-6-metóxi-1,4-benzoquinona, 2-octaprenil-3-metil-6-metóxi-1,4-benzoquinona, 3-demetilubiquinona-8, ubiquinona-8 ou uma combinação ou mistura de dois

ou mais desses.

Em algumas modalidades contempladas aqui, as composições de 3-HP podem conter uma mistura de 3-HP, e opcionalmente, um ou mais entre ácido 3,3-dioxopropínico e ácido acrílico.

5 Alguns métodos exemplificativos contemplados aqui concernem aumentar a produção ou tolerância à produção de um ácido orgânico por um microorganismo incluindo: obter um ou mais compostos capazes de modular os precursores de supervias de corismato pelo microorganismo onde a indução das supervias de corismato aumenta a produção ou tolerância ao ácido orgânico pelo microorganismo; e introduzir os compostos em uma cultura do
10 microorganismo.

Em alguns métodos mais particulares, aumentar a produção de ácido 3-hidroxi propiônico (3-HP) por um microorganismo pode incluir colocar uma cultura de microorganismo em contato com uma composição compreendendo um ou mais compostos de supervia de corismato ou capazes de modular a supervia de corismato. De acordo com essas modalidades, o composto pode incluir um vetor contendo um elemento genético capaz de modular a supervia de corismato. Outros métodos exemplificativos para aumentar a produção e/ou tolerância de ácido 3-hidroxi propiônico (3-HP) por um microorganismo podem incluir manipular geneticamente as supervias de corismato no microorganismo. A manipulação genética da supervia de corismato como contemplado aqui pode incluir alterar a expressão genética de um ou mais genes envolvidos na supervia de corismato em um microorganismo adicionando um vetor para introduzir o novo material genético; inserção genética, divisão ou remoção de material genético existente; mutação de
20 material genético ou uma combinação de dois ou mais desses.

As inserções genéticas exemplificativas incluem modular os níveis intracelulares de um ou mais entre corismato, tirosina, fenilalanina, triptofano, folato, ubiquinona, meniquinona, isozimas da 3-deóxi-D-arbinoheptulosonato-7-fosfato sintase (DAHPS), chiquimato, D-Eritrose-4-fosfato,
30 3-deóxi-D-arbinoheptulosonato-7-fosfato, 3-desidroquinato, 3-desidrochiquimato, chiquimato, chiquimato-3 -fosfato, 5-enolpiruvil-chiquimato-3-

fosfato, corismato, isocorismato, prefenato, fenilpiruvato, para- hidroxifenilpi-
 ruvato, L-fenilalanina, L-tirosina, 2,3-di-hidro-2,3-di-hidroxibenzoato, 2,3-di-
 hidroxibenzoato, enterobactina, 2-succinil-6-hidróxi-2,4-ciclo-hexadieno-1-
 5 carboxilato, o-succinibenzoato, o-succinilbenzoil-coA, 1,4-di-hidróxi-2-
 naptoato, menaquinona, antranilato, N-(5'-fosforibosil)-antranilato, 1-(o-
 carboxifenilamino)-1'-desoxirribulose-5'-fosfato, indol-3-glicerol-fosfato, indol,
 L-triptofano, 4-amino- 4-desoxicorismato, para-aminobenzoato, 7,8-di-
 hidropteroato, 7,8-di-hidrofolato, tetra-hidrofolato, 4-hidroxibenzoato, 3-
 octaprenil-4-hidroxibenzoato, 2-octaprenilfenol, 2,2-octaprenil-6-hidroxifenol,
 10 2-octaprenil-6-metóxi-1,4-benzoquinona, 2-
 octaprenil-3-metil-6-metóxi 1,4-benzoquinona, 3-demetilubiquinona-8, ubi-
 quinona-8 e uma combinação ou mistura de dois ou mais desses.

Em algumas modalidades, os kits são contemplados para uso de
 composições e métodos contemplados aqui. Algumas modalidades incluem
 15 kits para aumentar a produção de um ácido orgânico em um microorganismo
 compreendendo; um ou mais compostos capazes de modular as supervias
 de corismato; e um ou mais recipientes. De acordo com essas modalidades,
 os kits de uso aqui podem proporcionar alteração da supervia de corismato
 ou composições suplementares capazes de alterar o fluxo da supervia de
 20 corismato em um microorganismo de uso para produzir 3-HP. Algumas mo-
 dalidades podem incluir, porém sem caráter limitativo, um ou mais compos-
 tos selecionados a partir de corismato, tirosina, fenilalanina, triptofano, folato,
 ubiquinona, meniquinona, isozimas da 3-deóxi-D-arbino-heptulosonato-7-
 fosfato sintase (DAHPS), chiquimato, D-Eritrose-4-fosfato, 3-deóxi-D-
 25 arabino-heptulosonato-7-fosfato, 3-desidroquinato, 3-desidro-chiquimato,
 chiquimato, chiquimato-3-fosfato, 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato, corisma-
 to, isocorismato, prefenato, fenilpiruvato, para-hidroxifenilpiruvato, L-
 fenilalanina, L-tirosina, 2,3-di-hidro-2,3-di-hidroxibenzoato, 2,3-di-
 hidroxibenzoato, enterobactina, 2-succinil-6-hidróxi-2,4-ciclo-hexadieno-1-
 30 carboxilato, o-succinibenzoato, o-succinilbenzoil-coA, 1,4-di-hidróxi-2-
 naptoato, menaquinona, antranilato, N-(5'- fosforibosil)-antranilato, 1-(o-
 carboxifenilamino)- 1'-desoxirribulose-5'-fosfato. indol-3-glicerol-fosfato, in-

dol, L-triptofano, 4-amino-4-desoxicorismato, para-aminobenzoato, 7,8-dihidropteroato, 7,8-di-hidrofolato, tetra-hidrofolato, 4-hidroxibenzoato, 3-octaprenil-4-hidroxibenzoato, 2-octaprenilfenol, 2,2-octaprenil-6-hidroxifenol, 2-octaprenil-6-metóxi-1,4-benzoquinona, 2-octaprenil-3-metil-6-metóxi-1,4-benzoquinona, 3-demetilubiquinona-8, ubiquinona-8 e uma combinação ou mistura de dois ou mais desses.

Em algumas modalidades contempladas aqui, as composições podem incluir uma composição capaz de modular o fluxo de metabólitos através da supervia de corismato, para aumentar e/ou reduzir a produção de metabólito através da via. Em alguns exemplos, o aumento no fluxo pode ser de D-eritrose-4-fosfato a chiquimato; e/ou de chiquimato a corismato; e/ou de corismato a para-aminobenzoato; e/ou de corismato a ubiquinona; e/ou de corismato a triptofano; e/ou de corismato a prefenato; e/ou de corismato a isocorismato; e/ou de para-aminobenzoato a tetra-hidrofolato; e/ou de prefenato a L-fenilalanina; e/ou de prefenato a Tirosina; e/ou de isocorismato a enterobactina de isocorismato a meniquinona; e/ou de tirosina a tiamina.

Em algumas modalidades, manipulações genéticas podem ser realizadas para alterar as concentrações intracelulares de intermediários na supervia de corismato. De acordo com essas modalidades, essa via pode ser retroinibida causando uma redução em um ou mais intermediários particulares podendo-se prever uma redução na retroinibição e, desse modo, aumentar o fluxo através da supervia de corismato e a disponibilidade dos produtos a jusante que foram mostrados para aumentar a tolerância a 3-HP. Em algumas modalidades, a manipulação genética pode ser usada para reduzir a quantidade de um intermediário da supervia de corismato e essa redução pode resultar em um aumento na tolerância de 3-HP por microorganismos.

Contempla-se que um ou mais genes da supervia de corismato usados nos métodos e composições podem incluir todo ou parte do gene para modular a via. Por exemplo, talvez 30 por cento de um gene ou mais, 50 por cento de um gene ou mais, 70 por cento de um gene ou mais, ou 80 por cento de um gene ou mais, ou 90 por cento de um gene ou mais, ou ainda

100 por cento de um gene ou mais podem ser usados nos métodos e composições contemplados aqui para aumentar a tolerância a 3-HP em um microorganismo (veja, por exemplo, o gene Tyr A). Em algumas modalidades os oligonucleotídeos que compreendem pelo menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, ou mais nucleotídeos contíguos com uma sequência selecionada de genes envolvidos na supervia de corismato são contemplados. Ademais, métodos de combinação que utilizam manipulação genética e outros métodos de indução de tolerância são contemplados.

A tolerância a 3-HP é importante visto que a tolerância aumentada pode resultar em produtividades e titulações aumentadas em uma fermentação comercial para produzir 3-HP. O modelo de fermentação básico envolve a conversão de material residual ou matéria-prima de açúcar renovável (por exemplo, milho) em açúcares (por exemplo, hexoses, pentoses) que podem ser fermentados por organismos elaborados para produzir produtos com maior valor agregado, tais como, combustíveis (por exemplo, etanol ou hidrogênio) ou produtos químicos de base (por exemplo, monômeros/polímeros), tal como, 3-HP. O 3-HP pode ser convertido em produtos químicos de alto valor que podem ser interessantes para a indústria química, biotecnologia, vestuário e possivelmente indústria de cuidados com a saúde incluindo novos polímeros e materiais, bem como produtos químicos com vasto campo de atuação tradicionais, tais como, ácido acrílico, acrilamida, metil-acrilato, 1,3 propanodiol.

Ácidos Nucleicos

Os ácidos nucleicos dentro do escopo contemplados aqui podem ser feitos por meio de qualquer técnica conhecida por um versado na técnica. Exemplos de ácidos nucleicos, particularmente oligonucleotídeos sintéticos, podem incluir um ácido nucleico feito por síntese química *in vitro* utilizando fosfotriéster, fosfito ou química com fosforamidita e técnicas em fase sólida através de intermediários de H-fosfonato desoxinucleosídeo. Em algumas modalidades, as sequências de ácido nucleico contempladas aqui podem ser geradas e podem ser modificadas. Exemplos de sequências de

ácido nucleico modificadas incluem aquelas que podem ser modificadas após reações de amplificação, tais como, a PCR[®] ou a síntese de oligonucleotídeos. Exemplos de ácidos nucleicos biologicamente produzidos incluem a produção de ácido nucleico recombinante em células vivas, tal como, a
5 produção de vetor de DNA recombinante em bactérias.

Nucleobase, nucleosídeo e simulações de nucleotídeo ou derivados são bem conhecidos na técnica, e foram descritos. Nucleobases de purina e pirimidina incluem purinas e pirimidinas naturalmente ocorrentes e derivados e simulações dessas. Essas incluem, porém sem caráter limitati-
10 vo, purinas e pirimidinas substituídas por um ou mais grupos alquila, carboxialquila, amino, hidroxila, halogênio (por exemplo, flúor, cloro, bromo ou iodo), tiol ou alquiltiol. Os substituintes de alquila podem compreender de cerca de 1, 2, 3, 4 ou 5 a cerca de 6 átomos de carbono.

Exemplos de purinas e pirimidinas contemplados para modificar
15 ácidos nucleicos produzidos aqui podem incluir, porém sem caráter limitativo, deazapurinas, 2,6-diaminopurina, 5-fluorouracil, xantina, hipoxantina, 8-bromoguanina, 8-cloroguanina, bromotimina, 8-aminoguanina, 8-hidroxiguanina, 8-metilguanina, 8-tioguanina, azaguaninas, 2-aminopurina, 5-etilcitosina, 5-metilcitosina, 5-bromouracil, 5-etiluracil, 5-iodouracil, 5-
20 clorouracil, 5-propiluracil, tiouracil, 2-metiladenina, metiltioadenina, N,N-dimetiladenina, azaadeninas, 8-bromoadenina, 8-hidroxiadenina, 6-hidroxiaminopurina, 6-tiopurina, 4-(6-amino-hexil/citosina), e similares. Ademais, os derivados ou simulações de purina e pirimidina podem ser usados como substituições de base em qualquer método descrito aqui.

25 Para aplicações onde os segmentos de ácido nucleico são incorporados em vetores, tais como, plasmídeos, cosmídeos ou vírus, esses segmentos podem ser combinados com outras sequências de DNA, tais como, promotores, sinais de poliadenilação, sítios de enzima de restrição, sítios de clonagem múltipla, outros segmentos de codificação e similares, de
30 modo que seu comprimento total possa variar de maneira considerável. Contempla-se que um fragmento de ácido nucleico de quase qualquer comprimento pode ser empregado, com o comprimento total, de preferência, limita-

do pela facilidade de preparação e uso no protocolo de DNA recombinante pretendido.

Em algumas modalidades, os segmentos de DNA que codificam um gene específico podem ser introduzidos em células hospedeiras recombinantes e empregados para expressar uma proteína estrutural ou reguladora específica. Alternativamente, por meio da aplicação de técnicas de engenharia genética, subparcelas ou derivados de genes selecionados podem ser empregadas. As regiões a montante contendo regiões reguladoras, tais como, regiões de promotor podem ser isoladas e subsequentemente empregadas para expressão de um gene selecionado ou segmento de gene selecionado.

Onde um produto de expressão for gerado, é possível que a sequência de ácido nucleico seja variada ao mesmo tempo em que mantém a capacidade de codificar o mesmo produto.

15 Amplificação

A amplificação também pode ser útil no processo iterativo para gerar múltiplas cópias de uma determinada sequência de ácido nucleico. Dentro do escopo, a amplificação pode ser realizada por qualquer meio conhecido na técnica.

20 Iniciadores

O iniciador, como necessário aqui, pretende incluir qualquer ácido nucleico que é capaz de ativar a síntese de um ácido nucleico inicial em um processo modelo-dependente. Tipicamente, os iniciadores são oligonucleotídeos com cerca de 5-100 pares de base de comprimento, porém sequências maiores podem ser empregadas. Os iniciadores podem ser proporcionados em forma de cadeia dupla ou cadeia simples.

Em algumas modalidades, a amplificação de uma região aleatória é produzida ao misturar quantidades equimolares de cada base de nitrogênio (A,C,G e T) em cada posição para criar um grande número de permutações (por exemplo, onde "n" é o comprimento de cadeia oligo) em um segmento muito curto. Isso proporciona possibilidades mais abundantes para encontrar sequências de ácido nucleico de alta afinidade quando compa-

rado com 10,9 a 1011 variantes de anticorpos murinos produzidos por um único camundongo.

Inúmeros processos modelo-dependentes estão disponíveis para amplificar sequências marcadoras presentes em uma determinada amostra de modelo. Um dos métodos de amplificação mais conhecidos é a reação em cadeia da polimerase (referida como PCR) que é descrita em detalhes na Patente Nos. U.S. 4.683.195, 4.683.202 e 4.800.159, incorporada aqui a título de referência em sua totalidade.

Em outras modalidades, outros métodos de amplificação de ácidos nucleicos incluem, porém sem caráter limitativo, a reação em cadeia da ligase ("LCR"), métodos de amplificação isotérmica Qbeta Replicase, e Amplificação por Deslocamento de Fita (SDA), bem como outros métodos conhecidos na técnica. Ainda outros métodos de amplificação podem ser usados de acordo com as modalidades descritas aqui. Outros procedimentos de amplificação de ácidos nucleicos podem incluir sistemas de amplificação baseada em transcrição (TAS), inclusive amplificação baseada em sequência de ácido nucleico (NASBA). Em alguns métodos descritos, as sequências de ácido nucleico podem ser preparadas para amplificação por extração de fenol/clorofórmio padrão, desnaturação térmica de uma amostra clínica, tratamento com tampão de lise e colunas mini-spin para isolamento de DNA e RNA ou extração de cloreto de guanidínio de RNA. Em uma reação cíclica isotérmica, os RNA's são submetidos à transcrição reversa em DNA de cadeia dupla e mais uma vez submetidos à transcrição com uma polimerase, tal como, T7 ou SP6.

As polimerases e Transcriptases Reversas incluem, porém sem caráter limitativo, DNA Polimerases termoestáveis: OnmiBase™. Sequencing Enzyme Pfu DNA Polymerase Taq DNA Polymerase Taq DNA Polymerase, Sequencing Grade TaqBead™. Hot Start Polymerase AmpliTaq Gold Tfi DNA Polymerase Tli DNA Polymerase Tth DNA Polymerase DNA POLYMERASES: DNA Polymerase I, Klenow Fragment, Exonuclease Minus DNA Polymerase I DNA Polymerase I Large (Klenow) Fragment Terminal Deoxynucleotidyl Transferase T4 DNA Polymerase Reverse Transcriptases:

AMV Reverse Transcriptase M-MLV Reverse Transcriptase.

Em algumas modalidades, pode ser desejável incorporar um marcador nas sequências de ácido nucleico, produtos de amplificação, sondas ou iniciadores. Inúmeros marcadores diferentes podem ser usados, inclusive, porém sem caráter limitativo, fluoróforos, cromóforos, radioisótopos, marcadores enzimáticos, anticorpos, quimiluminescentes, eletroluminescentes e marcadores de afinidade.

Exemplos de marcadores de afinidade contemplados aqui, podem incluir, porém sem caráter limitativo, um anticorpo, um fragmento de anticorpo, uma proteína receptora, um hormônio, biotina, DNP, e qualquer molécula de polipeptídeo/proteína que se liga a um marcador de afinidade.

Exemplos de marcadores enzimáticos incluem, porém sem caráter limitativo, urease, fosfatase alcalina ou peroxidase. Os substratos de indicador colorimétrico podem ser empregados com tais enzimas para proporcionar um meio de detecção visível ao olho humano ou espectrofotometricamente visível.

Os seguintes fluoróforos descritos aqui incluem, porém sem caráter limitativo, Alexa 350, Alexa 430, AMCA, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665, BODIPY-FL, BODIP Y-R6G, BODIPY-TMR, BODIPY-TRX, Cascade Blue, Cy2, Cy3, Cy5,6-FAM, Fluorescein, HEX, 6-JOE, Oregon Green 488, Oregon Green 500, Oregon Green 514, Pacific Blue, REG, Rhodamine Green, Rhodamine Red, ROX, TAMRA, TET, Tetrametilrhodamine e Texas Red.

Eletroforese de Gel

Em algumas modalidades, a eletroforese de gel pode ser usada para separar, purificar parcialmente ou purificar um componente identificado ou contemplado aqui utilizando métodos padrão conhecidos na técnica.

A separação por eletroforese se baseia em métodos conhecidos na técnica. As amostras separadas dessa maneira podem ser visualizadas por coloração e quantificação, em termos relativos, utilizando densitômetros que monitoram continuamente a densidade fotométrica da cepa resultante. O eletrólito pode ser contínuo (um único tampão) ou descontínuo, onde uma

amostra é empilhada por meio de descontinuidade de tampão, antes de entrar no gel de separação/tampão de separação.

Técnicas Cromatográficas

Alternativamente, técnicas cromatográficas podem ser empregadas para realizar a separação. Há muitos tipos de cromatografia que podem ser usados, por exemplo: adsorção, divisão, troca iônica e peneira molecular, e muitas técnicas especializadas para utilizá-los incluindo cromatografia em coluna, papel, camada delgada e gás.

Técnicas Microfluidicas

As técnicas microfluidicas incluem separação em uma plataforma, tais como, microcapilares, projetadas por ACLARA BioSciences Inc., ou os circuitos integrados líquidos LabChip[®] feitos por Caliper Technologies Inc. Essas plataformas microfluidicas exigem apenas volumes em nanolitro da amostra, ao contrário dos volumes em microlitros exigidos por outras tecnologias de separação. A miniaturização de alguns processos envolve realizar a análise genética utilizando técnicas microfluidicas conhecidas.

Liberação de Ácido Nucleico

Formulações Lipossômicas

Em algumas amplas modalidades da invenção, os oligo ou polinucleotídeos e/ou vetores de expressão podem ser aprisionados em um lipossoma. Os lipossomas são estruturas vesiculares caracterizadas por uma membrana bicamada de fosfolípido e um meio aquoso interno. Os lipossomas multilamelares possuem múltiplas camadas lipídicas separadas por meio aquoso. Os componentes lipídicos são submetidos a autorrearranjo antes da formação de estruturas fechadas e aprisionam água e solutos dissolvidos entre as bicamadas lipídicas (Ghosh and Bachhawat, 1991). Também são contemplados complexos de ácido nucleico-lípido catiônicos, tais como, complexos de ácido nucleico de lipofectamina.

Em algumas modalidades da invenção, o lipossoma pode ser complexado com um vírus hemaglutinante (HVJ). Isso foi mostrado para facilitar a fusão com a membrana celular e promover a entrada celular de DNA encapsulado em lipossoma (Kaneda et al, 1989). Em outras modalidades, o

lipossoma pode ser complexado ou empregado em conjunto com proteínas cromossômicas não-histona nucleares (HMG 1) (Kato et al., 1991). Ainda em modalidades adicionais, o lipossoma pode ser complexado ou empregado em conjunto com HVJ e HMG1. Com isso, tais vetores de expressão foram empregados de maneira bem sucedida na transferência e expressão de um polinucleotídeo in vitro e in vivo, então esses são aplicáveis na presente invenção. Onde um promotor bacteriano for empregado no constructo de DNA, também será desejável incluir dentro do lipossoma uma polimerase bacteriana adequada.

"Lipossoma" é um termo genérico que inclui uma variedade de veículos lipídicos separados e multilamelares formados pela geração de bicamadas lipídicas encerradas. Os fosfolipídeos são usados para preparar os lipossomas de acordo com a presente invenção e podem transportar uma carga positiva líquida, uma carga negativa líquida ou são neutros. O dicetil fosfato pode ser empregado para conferir uma carga negativa aos lipossomas, e estearilamina pode ser usada para conferir uma carga positiva aos lipossomas.

Os lipídeos adequados para uso de acordo com a presente invenção podem ser obtidos a partir de fontes comerciais. Por exemplo, dimiristil fosfatidilcolina ("DMPC") pode ser obtido junto à Sigma Chemical Co., dicetil fosfato ("DCP") é obtido junto à K & K Laboratories (Plainview, NY); colesterol ("Chol") é obtido junto à Calbiochem Behring; dimiristil fosfatidilglicerol ("DMPG") e outros lipídeos podem ser obtidos junto à Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, Ala.). As soluções de estoque de lipídeos em clorofórmio, clorofórmio/metanol ou t-butanol podem ser armazenadas a cerca de 20°C. De preferência, clorofórmio é usado como o único solvente visto que esse é mais facilmente evaporado do que o metanol.

Os fosfolipídeos de fontes naturais, tais como, fosfatidilcolina de ovo ou soja, ácido fosfatídico cerebral, fosfatidilinositol cerebral ou vegetal, cardiolipina de coração e fosfatidiletanolamina vegetal ou bacteriana, de preferência, não são usados como o fosfatídeo primário, ou seja, constituindo 50% ou mais da composição de fosfatídeo total, devido à instabilidade e va-

zamento dos lipossomas resultantes.

Os lipossomas usados de acordo com as modalidades aqui podem ser feitos por métodos diferentes. O tamanho dos lipossomas varia dependendo do método de síntese. Um lipossoma suspenso em uma solução aquosa está geralmente no formato de uma vesícula esférica, possuindo uma ou mais camadas concêntricas de moléculas bicamada lipídicas. Cada camada consiste em um arranjo paralelo de moléculas representado pela fórmula XY, onde X é uma porção hidrofílica e Y é uma porção hidrofóbica. Em suspensão aquosa, as camadas concêntricas são arranjadas de modo que as porções hidrofílicas tendam a permanecer em contato com uma fase aquosa e as regiões hidrofóbicas tendam a se autoassociar. Por exemplo, quando as fases aquosas estiverem presentes tanto dentro como fora do lipossoma, as moléculas lipídicas irão formar uma bicamada, conhecida como lamela, do arranjo XY YX.

Os lipossomas dentro do escopo aqui podem ser preparados de acordo com técnicas de laboratório conhecidas.

Em algumas modalidades, a dioleoilfosfatidilcolina lipídica é empregada. Os oligonucleotídeos resistentes à nuclease foram misturados com lipídeos na presença de excesso de butanol. A mistura foi agitada no vórtex antes de ser congelada em um banho de acetona/gelo seco. A mistura congelada foi liofilizada e hidratada com salina tamponada com HEPES (1 mM de HEPES, 10 mM de NaCl, pH 7,5) durante a noite, e então os lipossomas foram sonicadas em um sonicador durante 10 a 15 min. O tamanho dos oligonucleotídeos lipossômicos variou tipicamente entre 200 e 300 nm de diâmetro como determinado pelo dimensionador (sizer) de partícula submicron de auto diluição submicron particle sizer autodilute modelo 370 (Nicomp, Santa Barbara, CA).

Mutagênese Sítio-Específica

A mutagênese sítio-específica é uma técnica útil na preparação de peptídeos individuais ou proteínas ou peptídeos equivalentes biologicamente funcionais, através da mutagênese específica do DNA subjacente. A técnica proporciona ainda uma rápida capacidade de preparar e testar vari-

antes de sequência, incorporando uma ou mais das considerações anteriores, ao introduzir uma ou mais alterações de sequência nucleotídica no DNA. A mutagênese-sítio específica permite a produção de mutantes através do uso de sequências de oligonucleotídeo específicas que codificam a sequência de DNA da mutação desejada, bem como um número suficiente de nucleotídeos adjacentes, para fornecer uma sequência iniciadora de tamanho suficiente e complexidade de sequência para formar um duplex estável em ambos os lados da junção de deleção que é atravessada. Um iniciador de cerca de 15 a 30 nucleotídeos de comprimento pode ser usado, com cerca de 5 a 10 resíduos em ambos os lados da junção da sequência que é alterada.

Em geral, a técnica de mutagênese sítio-específica é bem conhecida. Conforme será avaliado, a técnica geralmente emprega um vetor bacteriófago que está presente tanto em uma forma de cadeia simples como cadeia dupla. Os vetores típicos úteis em mutagênese sítio-dirigida incluem vetores, tal como, o fago M 13. Esses vetores de fago estão comercialmente disponíveis e seu uso é geralmente bem conhecido pelos versados na técnica. Os plasmídeos de cadeia dupla também são rotineiramente empregados em mutagênese sítio-dirigida, isso elimina a etapa de transferência do gene de interesse de um fago para um plasmídeo.

Em geral, a mutagênese sítio-dirigida pode ser realizada, primeiro, ao obter um vetor de cadeia simples ou fundir as duas cadeias de um vetor de cadeia dupla que inclui dentro de sua sequência uma sequência de DNA que codifica a proteína desejada. Um iniciador de oligonucleotídeo dotado da sequência modificada desejada é sinteticamente preparado. Esse iniciador pode ser então temperado com a preparação de DNA de cadeia simples e submetido a enzimas de polimerização de DNA, tal como, fragmento Klenow da polimerase I de *E. coli*, para completar a síntese da cadeia dotada de mutação. Assim, um heteroduplex é formado onde uma cadeia codifica a sequência não-modificada original e a segunda cadeia dotada da mutação desejada. Esse vetor heteroduplex é então usado para transformar as células apropriadas, tais como, células de *E. coli* e os clones que são se-

leccionados incluem vetores recombinantes dotados do arranjo de sequência modificado.

A preparação de variantes de sequência do gene selecionado utilizando mutagênese sítio-dirigida é proporcionada como um meio para
5 produzir espécies potencialmente úteis e não pretende ser limitativa, visto que há outras maneiras pelas quais variantes de sequência de genes podem ser obtidos. Por exemplo, os vetores recombinantes que codificam o gene desejado podem ser tratados com agentes mutagênicos, tal como, hidroxilamina, para obter variantes de sequência.

10 Proteínas Expressas ou Fragmentos Dessas

Exemplos de sistemas de expressão conhecidos pelos versados na técnica incluem bactérias, tal como, *E. coli*, levedura, tal como, *Pichia pastoris*, baculovírus e sistemas de expressão de mamíferos, tais como, em células Cos ou CHO. Um gene completo pode ser expresso ou, alternativa-
15 mente, fragmentos do gene que codificam partes do polipeptídeo podem ser produzidos.

Em algumas aplicações amplas aqui, uma sequência genética que codifica um polipeptídeo é analisada para detectar sequências transmembrana putativas. Tais sequências são tipicamente muito hidrofóbicas e
20 são facilmente detectadas pelo uso de software de análise de sequência padrão, tal como, Mac Vector (IBI, New Haven, CT). A presença de sequências transmembrana é geralmente deletéria quando uma proteína recombinante for sintetizada em diversos sistemas de expressão, especialmente *E. coli*, visto que resulta na produção de agregados insolúveis que são difíceis de se
25 renaturar na conformação nativa da proteína. A deleção de sequências transmembrana tipicamente não alteram de maneira significativa a conformação da estrutura protéica restante.

Para expressar uma proteína ou peptídeo codificado recombinante, seja mutante ou de ocorrência natural, de acordo com a presente
30 descrição alguém poderia preparar um vetor de expressão que inclui sequências de ácido nucleico sob o controle de, ou operativamente ligadas a, um ou mais promotores. Para colocar uma sequência de codificação "sob o

controle de um promotor, alguém pode posicionar a extremidade 5' do sítio de iniciação de transcrição do quadro de leitura transcricional geralmente entre cerca de 1 e cerca de 50 nucleotídeos "a jusante" (por exemplo, 3') do promotor selecionado. O promotor "a montante" estimula a transcrição do DNA e promove a expressão da proteína recombinante codificada.

Muitas técnicas estão disponíveis para construir os vetores de expressão contendo os ácidos nucleicos adequados e sequências de controle transcricional/translacional para realizar a expressão de proteína ou peptídeo em uma variedade de sistemas de expressão de hospedeiro. Os tipos de células disponíveis para expressão incluem, porém sem caráter limitativo, bactérias, tais como, *E. coli* e *B. subtilis* transformadas por vetores de expressão de DNA de bacteriófago recombinante, DNA de plasmídeo ou DNA de cosmídeo.

Alguns exemplos de hospedeiros procarióticos são cepas RR1 de *E. coli*, LE392 *E. coli*, *E. coli* B, *E. coli* X 1776 (ATCC No. 31537) bem como *E. coli* W3110 (F-, lambda-, prototrophic, ATCC No. 273325); bacilos, tais como, *Bacillus subtilis*; e outras enterobacteriaceae, tais como, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, e várias espécies de *Pseudomonas*.

Em geral, os vetores plasmidiais contendo replicon e sequências de controle que são derivadas de espécies compatíveis com a célula hospedeira são usados em conjunto com esses hospedeiros. O vetor geralmente transporta um sítio de replicação, bem como sequências de marcação que são capazes de proporcionar seleção fenotípica em células transformadas. Por exemplo, *E. coli* é geralmente transformada utilizando pBR322, um plasmídeo derivado de uma espécie de *E. coli*. pBR322 contém genes para resistência a ampicilina e tetraciclina e, desse modo, proporcionar meios fáceis para identificar células transformadas. O plasmídeo pBR, ou outro plasmídeo microbial ou fago também deve conter, ou ser modificado para conter, promotores que podem ser usados pelo organismo microbial para expressão de suas próprias proteínas.

Ademais, os vetores de fago contendo replicon e sequências de controle que são compatíveis com o microorganismo hospedeiro podem ser

usados como vetores de transformação em conjunto com esses hospedeiros. Por exemplo, o fago lambda GEMTM-11 pode ser utilizado para formar um vetor de fago recombinante que pode ser usado para transformar células hospedeiras, tal como, *E. coli* LE392.

5 Os vetores úteis adicionais incluem vetores pIN (Inouye et al, 1985); e vetores pGEX, para uso na geração de proteínas de fusão solúveis de glutathione S transferase (GST) para purificação e separação ou clivagem posterior. Outras proteínas de fusão adequadas são aquelas com β galactosidase, ubiquitina, ou similares.

10 Os promotores que são mais comumente usados em construção de DNA recombinante incluem a β -lactamase (penicilinase), sistemas promotores de lactose e triptofano (*trp*). Embora esses sejam os mais comumente usados, outros promotores microbiais foram descobertos e utilizados, e detalhes com relação a suas sequências de nucleotídeo foram publicados, permitindo que os versados na técnica os liguem funcionalmente com vetores plasmidiais.

15 Outros promotores adequados, que possuem a vantagem adicional de transcrição controlada por condições de crescimento, incluem a região de promotor para álcool desidrogenase 2, isocitocromo C, fosfatase
20 ácida, enzimas degradativas associadas com metabolismo de nitrogênio, e a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase anteriormente mencionada, e enzimas responsáveis pela utilização de maltose e galactose.

Além dos microorganismos, culturas de células derivadas de organismos multicelulares também podem ser usadas como hospedeiros. Em
25 princípio, qualquer cultura celular é viável, seja de cultura de vertebrados ou invertebrados.

Supervia de corismato e Tirosina

Contempla-se aqui que uma região de codificação moduladora de aminoácido de microorganismos podem ser importante para aumentar a
30 produção ou tolerância à produção de ácido orgânico pelo microorganismo. Em um método exemplificativo, as regiões genéticas que codificam enzimas biossintéticas de tirosina e a região genética que codifica um repressor de

genes envolvidos na produção de tirosina podem ser manipuladas para aumentar a tolerância ou produção de ácido orgânico por um microorganismo.

Em algumas modalidades, tirosina adicionada de maneira exógena pode ser adicionada a uma cultura bacteriana capaz de produzir 3-HP.

5 Em algumas modalidades particulares, as concentrações de tirosina podem ser cerca de 0,05mM a cerca de 0,5 mM. Em um exemplo, 0,2mM de tirosina foi adicionado a uma cultura e o aumento na produção de 3-HP foi de cerca de 35%.

10 As modalidades particulares da presente invenção referem-se a oligonucleotídeos que compreendem pelo menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 ou 40 nucleotídeos contíguos com uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, e SEQ ID NO:6 TyrA (essa sequência inclui 50 bp a montante e a jusante do desenho de iniciador):

15 SEQ ID NO:1 TCAGGATCTG AACGGGCAGC TGACGGCTCG
CGTGGCTTAA GAGGTTT

SEQ ID NO:2: TTATG GTT GCT GAA TTG ACC GCA TTA CGC GAT
CAA ATT GAT GAA GTC GAT AAA GCG CTG CTG AAT TTA TTA GCG
20 AAG CGT CTG GAA CTG GTT GCT GAA GTG GGC GAG GTG AAA AGC
CGC TTT GGA CTG CCT ATT TAT GTT CCG GAG CGC GAG GCA TCT
ATG TTG GCC TCG CGT CGT GCA GAG GCG GAA GCT CTG GGT GTA
CCG CCA GAT CTG ATT GAG GAT GTT TTG CGT CGG GTG ATG CGT
GAA TCT TAC TCC AGT GAA AAC GAC AAA GGA TTT AAA ACA CTT
25 TGT CCG TCA CTG CGT CCG GTG GTT ATC GTC GGC GGT GGC GGT
CAG ATG GGA CGC CTG TTC GAG AAG ATG CTG ACC CTC TCG GGT
TAT CAG GTG CGG ATT CTG GAG CAA CAT GAC TGG GAT CGA GCG
GCT GAT ATT GTT GCC GAT GCC GGA ATG GTG ATT GTT AGT GTG
CCA ATC CAC GTT ACT GAG CAA GTT ATT GGC AAA TTA CCG CCT
30 TTA CCG AAA GAT TGT ATT CTG GTC GAT CTG GCA TCA GTG AAA
AAT GGG CCA TTA CAG GCC ATG CTG GTG GCG CAT GAT GGT CCG
GTG CTG GGG CTA CAC CCG ATG TTC GGT CCG GAC AGC GGT AGC

CTG GCA AAG CAA GTT GTG GTC TGG TGT GAT GGA CGT AAA CCG
 GAA GCA TAC CAA TGG TTT CTG GAG CAA ATT CAG GTC TGG GGC
 GCT CGG CTG CAT CGT ATT AGC GCC GTC GAG CAC GAT CAG AAT
 ATG GCG TTT ATT CAG GCA CTG CGC CAC TTT GCT ACT TTT GCT
 5 TAC GGG CTG CAC CTG GCA GAA GAA AAT GTT CAG CTT GAG CAA
 CTT CTG GCG CTC TCT TCG CCG ATT TAC CGC CTT GAG CTG GCG
 ATG GTC GGG CGA CTG TTT GCT CAG GAT CCG CAG CTT TAT GCC
 GAC ATC ATT ATG TCG TCA GAG CGT AAT CTG GCG TTA ATC AAA
 CGT TAC TAT AAG CGT TTC GGC GAG GCG ATT GAG TTG CTG GAG
 10 CAG GGC GAT AAG CAG GCG TTT ATT GAC AGT TTC CGC AAG GTG
 GAG CAC TGG TTC GGC GAT TAC GCA CAG CGT TTT CAG AGT GAA
 AGC CGC GTG TTA TTG CGT CAG GCG AAT GAC AAT CGC CAG TAA
 SEQ ID NO: 3 TAATCCAGTG CCGGATGATT CACATCATCC
 GGCACCTTTT CATCAGGTTG
 15 SEQ ID NO:4 TCAGGATCTG AACGGGCAGC TGACGGCTCG
 CGTGGCTTAA GAGGTTTTTA TGGTT GCT GAA TTG ACC GCA TTA CGC
 GAT CAA ATT GAT GAA GTC GAT AAA GCG CTG CTG AAT TTA TTA
 GCG AAG CGT CTG GAA CTG GTT GCT GAA GTG GGC GAG GTG AAA
 AGC CGC TTT GGA CTG CCT ATT TAT GTT CCG GAG CGC GAG GCA
 20 TCT ATG TTG GCC TCG CGT CGT GCA GAG GCG GAA GCT CTG GGT
 GTA CCG CCA GAT CTG ATT GAG GAT GTT TTG CGT CGG GTG ATG
 CGT GAA TCT TAC TCC AGT GAAAAC GAC AAA GGA TTT AAAACA CTT
 TGT CCG TCA CTG CGT CCG GTG GTT ATC GTC GGC GGT GGC GGT
 CAG ATG GGA CGC CTG TTC GAG AAGATG CTG ACC CTC TCG GGT
 25 TAT CAG GTG CGG ATT CTG GAG CAA CAT GAC TGG GAT CGA GCG
 GCT GAT ATT GTT GCC GAT GCC GGAATG GTG ATT GTT AGT GTG
 CCAATC CAC GTT ACT GAG CAA GTT ATT GGC AAA TTA CCG CCT
 TTA CCGAAA GAT TGT ATT CTG GTC GAT CTG GCA TCA GTGAAAAAT
 GGG CCA TTA CAG GCC ATG CTG GTG GCG CAT GAT GGT CCG GTG
 30 CTG GGG CTA CAC CCG ATG TTC GGT CCG GAC AGC GGT AGC CTG
 GCAAAG CAA GTT GTG GTC TGG TGT GAT GGA CGT AAA CCG GAA
 GCA TAC CAA TGG TTT CTG GAG CAAATT CAG GTC TGG GGC GCT

CGG CTG CAT CGT ATT AGC GCC GTC GAG CAC GAT CAG AAT ATG
 GCG TTT ATT CAG GCA CTG CGC CAC TTT GCT ACT TTT GCT TAC
 GGG CTG CAC CTG GCA GAA GAAAAT GTT CAG CTT GAG CAA CTT
 CTG GCG CTC TCT TCG CCGATT TAC CGC CTT GAG CTG GCG ATG
 5 GTC GGG CGA CTG TTT GCT CAG GAT CCG CAG CTT TAT GCC GAC
 ATC ATT ATG TCG TCA GAG CGT AAT CTG GCG TTAATC AAA CGT
 TAC TAT AAG CGT TTC GGC GAG GCGATT GAG TTG CTG GAG CAG
 GGC GAT AAG CAG GCG TTT ATT GAC AGT TTC CGC AAG GTG GAG
 CAC TGG TTC GGC GAT TAC GCA CAG CGT TTT CAG AGT GAAAGC
 10 CGC GTG TTA TTG CGT CAG GCG AAT GAC AAT CGC CAG TAA TA-
 ATCCAGTG CCGGATGATT CACATCATCC GGCACCTTTT CATCAGGTTG

SEQ ID NO: 5 TyrR e SEQ ID NO: 6 possui TyrR com os dois iniciadores em cada extremidade.

SEQ ID NO: 5 ATGCGTCTGG AAGTCTTTTG TGAAGACCGA
 15 CTCGGTCTGA CCCGCGAATT ACTCGATCTA CTCGTGCTAA GAGG-
 CATTGA TTTACGCGGT ATTGAGATTG ATCCCATTGG GCGAATCTAC
 CTCAATTTTG CTGAACTGGA GTTTGAGAGT TTCAGCAGTC
 TGATGGCCGA AATACGCCGT ATTGCGGGTG TTACCGATGT GCG-
 TACTGTC CCGTGGATGC CTTCCGAACG TGAGCATCTG GCGTTGAGCG
 20 CGTTACTGGA GGC GTTGCCT GAACCTGTGC TCTCTGTCGA TATGAA-
 AAGC AAAGTGGATA TGGCGAACCC GGCGAGCTGT CAGCTTTTTG
 GGCAAAAATT GGATCGCCTG CGCAACCATA CCGCCGCACA ATTGAT-
 TAAC GGCTTTAATT TTTTACGTTG GCTGGAAAGC GAACCGCAAG
 ATTCGCATAA CGAGCATGTC GTTATTAATG GGCAGAATTT CCTGATG-
 25 GAG ATTACGCCTG TTTATCTTCA GGATGAAAAT GATCAACACG
 TCCTGACCGG TCGGGTGGTG ATGTTGCGAT CAACGATTCTG
 TATGGGCCGC CAGTTGCAAA ATGTCGCCGC CCAGGACGTC
 AGCGCCTTCA GTCAAATTGT CGCCGTCAGC CCGAAAATGA AG-
 CATGTTGT CGAACAGGCG CAGAACTGG CGATGCTAAG
 30 CGCGCCGCTG CTGATTACGG GTGACACAGG TACAGGTAAA
 GATCTCTTTG CCTACGCCTG CCATCAGGCA AGCCCCAGAG CGGG-
 CAAACC TTACCTGGCG CTGAACTGTG CGTCTATACC GGAAGATGCG

GTCGAGAGTG AACTGTTTGG TCATGCTCCG GAAGGGAAGA AAG-
 GATTCTT TGAGCAGGCG AACGGTGGTT CGGTGCTGTT GGATGAAATA
 GGGGAAATGT CACCACGGAT GCAGGCGAAA TTA CTGCGTT TCCTTA-
 ATGA TGGCACTTTC CGTCGGGTTG GCGAAGACCA TGAGGTGCAT
 5 GTCGATGTGC GGGTGATTTG CGCTACGCAG AAGAATCTGG TCGA-
 ACTGGT GCAAAAAGGC ATGTTCCGTG AAGATCTCTA TTATCGTCTG
 AACGTGTTGA CGCTCAATCT GCCGCCGCTA CGTGA CTGTC CGCAG-
 GACAT CATGCCGTTA ACTGAGCTGT TCGTCGCCCG CTTTGCCGAC
 GAGCAGGGCG TGCCGCGTCC GAAACTGGCC GCTGACCTGA A-
 10 TACTGTACT TACGCGTTAT GCGTGGCCGG GAAATGTGCG GCAGTTA-
 AAG AACGCTATCT ATCGCGCACT GACACA ACTG GACGGTTATG
 AGCTGCGTCC ACAGGATATT TTGTTGCCGG ATTATGACGC CGCA-
 ACGGTA GCCGTGGGCG AAGATGCGAT GGAAGGTTTCG CTGGACGAAA
 TCACCAGCCG TTTTGAACGC TCGGTATTAA CCCAGCTTTA TCGCAAT-
 15 TAT CCCAGCACGC GCAA ACTGGC AAAACGTCTC GCGTTTTAC A-
 TACCGCGAT TGCCAATAAG TTGCGGGAAT ATGGTCTGAG TCAGAA-
 GAAG AACGAAGAGTAA

A sequência de AroF é:

SEQ ID NO:6 ATGCAAAAAG ACGCGCTGAA TAACGTACAT
 20 ATTACCGACG AACAGGTTTT AATGACTCCG GAACA ACTGA
 AGGCCGCTTT TCCATTGAGC CTGCAACAAG AAGCCCAGAT TGCT-
 GACTCG CGTAAAAGCA TTTCAGATAT TATCGCCGGG CGCGATCCTC
 GTCTGCTGGT AGTATGTGGT CTTGTTCCA TTCATGATCC GGAA-
 ACTGCT CTGGAATATG CTCGTCGATT TAAAGCCCTT GCCGCAGAGG
 25 TCAGCGATAG CCTCTATCTG GTAATGCGCG TCTATTTTGA AAA-
 ACCCGT ACCACTGTCTG GCTGGAAAGG GTTAATTAAC GATCCCCATA
 TGGATGGCTC TTTTGATGTA GAAGCCGGGC TGCAGATCGC GCGTAA-
 ATTG CTGCTTGAGC TGGTGAATAT GGGACTGCCA CTGGCGACGG
 AAGCGTTAGA TCCGAATAGC CCGCAATACC TGGGCGATCT GTT-
 30 TAGCTGG TCAGCAATTG GTGCTCGTAC AACGGAATCG CAACTCACC
 GTGAAATGGC CTCCGGGCTT TCCATGCCGG TTGGTTTTAA AAACGG-
 CACC GACGGCAGTC TGGCAACAGC AATTAACGCT ATGCGCGCCG

CCGCCCAGCC GCACCGTTTT GTTGGCATT ACCAGGCAGG
 GCAGGTTGCG TTGCTACAAA CTCAGGGGAA TCCGGACGGC CATGT-
 GATCC TGCGCGGTGG TAAAGCGCCG AACTATAGCC CTGCGGATGT
 TGCGCAATGT GAAAAAGAGA TGGAACAGGC GGGACTGCGC
 5 CCGTCTCTGA TGGTAGATTG CAGCCACGGT AATTCCAATA AAGAT-
 TATCG CCGTCAGCCT GCGGTGGCAG AATCCGTGGT TGCTCAAATC
 AAAGATGGCA ATCGCTCAAT TATTGGTCTG ATGATCGAAA GTAA-
 TATCCA CGAGGGCAAT CAGTCTTCCG AGCAACCGCG CAGTCAAATG
 AAATACGGTG TATCCGTAAC CGATGCCTGC ATTAGCTGGG AAAT-
 10 GACCGA TGCCTTGCTG CGTGAAATTC ATCAGGATCT GAACGGGCAG
 CTGACGGCTC GCGTGGCTTAA

EXEMPLOS

Os seguintes exemplos são incluídos para demonstrar algumas
 modalidades. Deve ser avaliado pelos versados na técnica que os métodos
 15 descritos nos exemplos a seguir representam métodos descobertos pelos
 inventores para operarem bem na prática de modalidades descritas aqui, e
 desse modo podem ser considerados para constituir modos exemplificativos
 para sua prática. Entretanto, os versados na técnica devem, em considera-
 ção com a presente descrição, avaliar que muitas alterações podem ser fei-
 20 tas em algumas modalidades que são descritas e ainda obterem um resulta-
 do parecido ou similar sem que se abandone o espírito e escopo da presente
 invenção.

Materiais e Métodos

Bactérias, Plasmídeos e Meios

25 Alguns métodos referem-se a *Escherichia coli* K12 (ATCC #
 29425) de ocorrência natural usada para a preparação de DNA genômico.
 As bibliotecas genômicas foram construídas utilizando o pSMART-LCKAN
 (Lucigen, Middleton, WI). As bibliotecas foram introduzidas na cepa *Escheri-*
chia coli Mach1-T1^R (Invitrogen, Carlsbad, CA.) para seleções como anteri-
 30 ormente detalhado. Mach1-T1^R contendo vetor vazio pSMART-LCKAN foram
 usados em todos os estudos de controle. As curvas de crescimento foram
 feitas em Meio Mínimo MOPS. Neste exemplo, a concentração de antibiótico

é 20 ug de canamicina/mL.

Construção de Biblioteca Genômica

As culturas de *E. coli* K12 foram cultivadas durante a noite em 500 ml de LB a 37°C a uma densidade óptica de 1,0 medida por absorbância a 600nm (OD₆₀₀). O DNA foi extraído utilizando um kit de Purificação de DNA Genômico (por exemplo, Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. Cinco amostras contendo 50 ug de DNA genômico purificado foram digeridas utilizando duas enzimas de restrição blunt-cutter: AluI e RsaI (por exemplo, Invitrogen). Ambas as enzimas possuem quatro sequências de identificação de par de bases e são usadas em conjunto para garantir uma digestão aleatória do DNA genômico. As reações de digestão foram realizadas com um volume total de 50 uL. As reações continham 1 unidade de RsaI, 1 unidade de AluI, 50mM de Tris-HCl (pH 8,0), e 10 mM de MgCl₂ e foram incubadas a 37°C durante 1, 2, 5, 10 e 15 minutos, respectivamente. O DNA parcialmente digerido foi imediatamente misturado e separado com base no tamanho utilizando eletroforese em gel de agarose. Os fragmentos de DNA de 0,5, 1, 2, 4, e mais de 8 kb foram cortados do gel e purificados com Gel Extraction Kit (por exemplo, Qiagen).

A pureza dos fragmentos de DNA foi quantificada utilizando absorbância UV, cada um com uma razão de absorbância A₂₆₀/A₂₈₀ >1,7. A ligação do DNA purificado, fragmentado com os vetores pSMART-Kan foi realizada com o Kit CloneSMART (Lucigen) de acordo com as instruções do fabricante. O produto de ligação foi então eletroporado em *E. coli* 10 GF' Elite Electrocompetent Cells (Lucigen), semeado em LB+canamicina, e incubado a 37°C durante 24 horas. As culturas de diluição com 1/1000 do volume de transformação original semeadas em LB+canamicina em triplicata para determinar a eficiência de transformação e números de transformante. As placas de diluição foram feitas em triplicata para determinar uma contagem precisa do número de transformantes para garantir uma biblioteca genômica representativa.

As colônias foram colhidas raspando delicadamente as placas em meio TB. As culturas foram imediatamente ressuspensas por vórtex, e

alocadas em culturas de estoque de refrigerador de 15-1 mL com uma concentração de glicerol final de 15 %v/p. O restante da cultura foi peletizado por centrifugação durante 15 minutos a 3000 rpm. O DNA de plasmídeo foi extraído. Para confirmar os tamanhos de inserção e números de transformante positivos, os plasmídeos foram isolados de clones aleatórios para cada tamanho de biblioteca utilizando, por exemplo, um kit Qiaprep Spin Mini-Prep de Qiagen (Valencia, CA). Os plasmídeos purificados foram então analisados por PCR ou digestão com enzimas de restrição. A PCR utilizando os iniciadores SL1 (SEQ ID NO: 7: 5'-CAG TCC AGT TAC GCT GGA GTC-3') e SR2 (SEQ ID NO: 8: 5'-GGT CAG GTA TGA TTT AA A TGG TCA GT) foi realizada em oito clones das bibliotecas de inserção de 0,5, 1, e 2 kbp. As digestões com enzima de restrição com a enzima EcorV foram realizadas por oito clones das bibliotecas de inserção de 2, 4 e 8 kbp. O exame por eletroforese mostrou que o número exigido de colônias continham uma inserção do tamanho esperado para representação adequada, quimeras não estavam presentes.

Transformação de Biblioteca de DNA

O DNA plasmidial purificado de cada biblioteca foi introduzido em MACH1[®]-T1^R(Invitrogen) por eletroporação. As culturas MACH1[®]-T1^R se tornaram eletrocompetentes por um procedimento de lavagem com glicerol padrão em gelo a uma concentração final de 10¹¹ células/ml (Sanbrook et al.). Um volume de 1/1000 das transformações originais foi semeado em LB+canamicina em triplicata para determinar a eficiência de transformação e números de transformantes adequados. As culturas originais foram combinadas e diluídas em 100 ml com meio mínimo MOPS + canamicina e incubadas a 37°C durante 6 horas ou até atingir um OD₆₀₀ de 0,20.

Seleções

Em um método exemplificativo, quatro bibliotecas genômicas representativas foram criadas a partir do DNA genômico de E. coli K12 com tamanhos de inserto definidos de 1, 2, 4 e 8 kb. A mistura de biblioteca transformada foi dividida em dois tubos com tampa de rosca de 15 mL com uma concentração final de 20 g/L 3-HP (TCI America) neutralizada em pH 7

com 10 M de NaOH. A densidade celular das culturas de seleção foi monitorada à medida que essas se aproximam de um OD₆₀₀ final de 0,3-0,4. As culturas de seleção originais foram subsequentemente usadas para inocular outra série de meio mínimo MOPS + canamicina+3-HP de 15 mL como parte de uma estratégia de seleção de lote repetido. As culturas de lote repetido contendo 3-HP foram monitoradas e inoculadas durante um período de 60 horas para aumentar a concentração de clones que exibem crescimento aumentado na presença de 3-HP. As amostras foram obtidas semeando-se 1 mL da população selecionada em placas seletivas com cada lote. O DNA plasmidial foi extraído de cada amostra, então, hibridizado em arranjos Affymetrix *E. coli* Antisense GeneChip® (Affymetrix, Santa Clara, CA).

Análise de Dados

A análise de dados foi realizada utilizando-se um pacote de software, o pacote de software SCALEs, (Pedido de Patente US No. 11/231.018 depositado em 20 de setembro de 2005, incorporado aqui a título de referência em sua totalidade). As contribuições de adaptação de elementos genômicos específicos foram calculadas a partir do enriquecimento de cada região como uma fração da população selecionada, como anteriormente descrito (Lynch, M., Warnecke, TE, Gill, RT, SCALEs: multiscale analysis of library enrichment. *Nature Methods*, 2007, 4(87-93), aqui incorporado a título de referência em sua totalidade). Os elementos genéticos e sua adaptação correspondente foram então segregados por via metabólica com base nas suas classificações de EcoCyc (ecocyc.org). Essa matriz de adaptação foi usada para calcular tanto a adaptação de via (W) como frequência de enriquecimento encontrada na população selecionada.

$$W_{\text{pathway}} = \sum_1^n W_i$$

Frequência = $\frac{\text{número de genes de frequência de via metabólica}}{\text{genes totais na via}}$

As redundâncias de atribuição de via foram identificadas por uma ordem de classificação inicial de adaptação de via, seguidas por uma

atribuição específica de elementos genéticos associados com múltiplas vias à via primária identificada na primeira classificação, e remoção subsequente dos valores de adaptação específicos de gene das vias secundárias.

Confirmações de Crescimento

5 As culturas noturnas de MachI-T1^R + pSMART LC-KAN foram inoculadas em 5 mL de LB + canamicina. As curvas de crescimento foram construídas por inoculação em tubos com tampa de rosca de 15mL contendo suplementos (Tabela 1) e 15 mL de Meio Mínimo MOPS + canamicina +3-HP da cultura noturna. As culturas foram incubadas a 37°C e a densidade
10 óptica foi monitorada a um OD₆₀₀ >0,2. As culturas foram diluídas a um OD₆₀₀=0,2 exato e foram usadas para inocular culturas contendo 15 mL de Meio Mínimo MOPS + canamicina+3-HP (pH=7,0) em uma densidade óptica inicial de 0,40 para minimizar os efeitos de crescimento em fase estacionária. A densidade óptica foi monitorada e registrada durante toda a faixa de
15 crescimento microaeróbico em meio mínimo, ou até um OD₆₀₀ final de 0,5-0,6. Os parâmetros de crescimento foram avaliados em termos de crescimento específico, OD₆₀₀ na culminação da fase de crescimento (aproximadamente 14 horas), e OD₆₀₀ em conclusão de fase de crescimento máximo e OD₆₀₀ final (24 h). Para atender as limitações intermediárias específicas, su-
20 plementos de via de corismato associados foram adicionados a concentrações finais listadas na Tabela 1.

Construção de clone

A PCR foi usada para amplificar o DNA genômico de E. coli K12 correspondente à região aroF-tyrA com iniciadores designados para incluir o
25 promotor aroFp a montante e os terminadores transcricionais independentes de rho. A ligação do DNA purificado, fragmentado com os vetores de pSMART-canamicina foi realizada com o Kit CloneSMART (Lucigen, Middleton, WI) de acordo com as instruções do fabricante. O produto de ligação foi então transformado em MACH1-T1R quimicamente competente (Invitrogen,
30 Carlsbad, CA), semeado em LB + canamicina e incubado a 37°C durante 24 horas. Para confirmar a inserção de transformantes positivos, os plasmídeos foram isolados de clones utilizando um Kit Qiaprep Spin MiniPrep de Qiagen

(Valencia, CA) e sequenciados (Macrogen, South Korea).

EXEMPLO 1

Em um método exemplificativo, uma seleção foi realizada durante 8 lotes de transferência em série com um gradiente de redução de 3-HP durante 60 horas. A população inicial foi compreendida de cinco bibliotecas genômicas de *E. coli* K12 representativas que foram transformadas em MA-CH1-TR e cultivadas em fase exponencial média correspondente a condições microaeróbicas ($OD_{600} \sim 0,2$). Os tempos de transferência de lote foram mantidos como parâmetros variáveis que foram ajustados conforme necessário para evitar um ambiente de seleção limitado de nutrientes. As amostras foram obtidas na culminação de cada lote na seleção, como descrito acima, e foram adicionalmente analisadas com o software SCALEs para decompor os sinais de microarranjo em clones de biblioteca correspondentes e calcular o enriquecimento relativo de regiões específicas ao longo do tempo. Desse modo, a ampla adaptação de genoma ($\ln(X_i/X_{i0})$) foi medida com base nos padrões de enriquecimento específico de região para a seleção na presença de um ácido orgânico industrialmente relevante, 3-HP.

A Figura 1 representa gráficos de ampla análise multiescala de genoma da seleção de 3-HP. Cada pico mostra o sinal (fração da população selecionada) representado pela região genômica correspondente. Os gráficos são representados como círculos devido ao cromossoma circular de *E. coli*, a posição genômica aumenta no sentido horário em torno de cada círculo com o primeiro e último par de bases do genoma ao meio dia. Cada gráfico A, B, C e D representa o sinal associado com as Escalas de 1000 bp, 2000 bp, 4000 bp e 8000 bp, respectivamente. Os números em torno dos círculos correspondem a genes que codificam componentes da supervia de corismato. Esses genes estavam sobre regiões genômicas que mostraram um enriquecimento considerável na seleção de 3-HP.

Uma vantagem da abordagem de SCALEs é a capacidade de controlar de maneira quantitativa a adaptação de uma população clonal na duração de seleção. A adaptação de clones individuais pode ser então segmentada por gene e adicionalmente categorizada por via, criando um amplo

espectro de genoma da adaptação de via contribuindo para a tolerância a 3-HP total. Utilizando-se esse método, diversas vias metabólicas importantes foram identificadas incluindo a maioria dos clones que contribuem para adaptação ao sistema (Figura 2). A Figura 2 representa os resultados de adaptação de via das 7 principais vias que contribuem para a adaptação total. A supervia de corismato foi identificada como a maior contribuição de adaptação total bem como a maior frequência de elementos genéticos contidos na população selecionada, com 19 elementos genéticos identificados nos 10% da população que exhibe adaptação aumentada (Figura 3A). A Figura 3

5 A representa a supervia de corismato de *E. coli*. Os níveis de enriquecimento de genes encontrados em 10% dos clones são realçados. Adicionalmente, 33 genes envolvidos na supervia de corismato exibiram ganhos de adaptação significativos e todos os 57 genes mostraram algum nível de enriquecimento durante a seleção. Assim, os clones contendo elementos genéticos

10 que codificam as enzimas necessárias a jusante de corismato demonstraram aumentos de adaptação significativos na presença de níveis inibidores de 3-HP. Essa descoberta indica que a inibição de crescimento observada associada com uma cultura na presença de 3-HP é o resultado de uma interrupção da via biossintética de corismato.

20 A Figura 3A representa um esquema da supervia de corismato. Os intermediários são marcados ou, de outro modo, indicados na junção das setas. Os nomes dos genes que codificam a função enzimática (setas) estão escritos próximos às setas correspondentes. A retroinibição negativa de produtos ou intermediários na via é mostrada como setas cinzas.

25 *Inibição de Via de Corismato*

Para confirmar essas descobertas, o meio de cultura foi suplementado com produtos sintetizados a jusante de corismato. A adição de cada produto estimulou individualmente o crescimento, confirmando adicionalmente que a inibição está ocorrendo na, ou antes da síntese de corismato

30 (Figura 3B). A Figura 3B representa confirmações de crescimento: adição de produtos a jusante de corismato alivia parcialmente a inibição de crescimento confirmada pelo crescimento específico aumentado (preto) e OD₆₀₀ au-

mentado na culminação da fase de crescimento (cinza). Entretanto, aumentar a suplementação de diversos produtos a jusante (tirosina, fenilalanina, triptofano) resulta na retroinibição da primeira etapa realizada da supervia de corismato e irá, portanto, reduzir a formação de outros produtos a jusante inclusive ubiquinona, meniquinona e tetra-hidrofolato e limitar os benefícios de crescimentos associados. Aqui, a adição de derivados de corismato ao meio de crescimento na ausência de 3-HP tem pouco ou nenhum efeito benéfico sobre o crescimento específico ou densidade celular final, confirmando ainda que a suplementação é 3-HP dependente. Para investigar adicionalmente a inibição observada, o intermediário de via de corismato central, chiquimato foi fornecido de maneira extracelular e resultou em um aumento de 20% em crescimento específico (Figura 3B).

A Figura 3B representa métodos exemplificativos para ilustrar a adaptação (taxa de crescimento aumentada na presença de 3-HP) associada com cópia aumentada de genes na supervia de corismato.

Ademais, na primeira etapa da via de corismato, Eritrose-4- fosfato (E-4-P) reage com fosfoenolpiruvato (PEP) para formar 3-deóxi-D-arbino-heptulose-7-fosfato. E-4-P é exigido por diversas vias importantes, inclusive a ramificação não-oxidativa da via pentose fosfato e a biossíntese de piridoxal-5'-fosfato (vitamina B6). Uma descoberta significa que o grupo E-4-não é limitado e que uma inibição ocorre mais provavelmente entre a formação de E-4-P e chiquimato. Em outro experimento, ribose, histidina e nucleotídeos foram adicionados ao meio de crescimento individualmente. Essas moléculas são subprodutos da biossíntese de histidina, purina e pirimidina, supervia (PRPP), que também contribui com adaptação significativa para a análise da via (Figura 3B)

Retroinibição Interrompida

Por meio do uso da metodologia SCALEs, inúmeros alvos genéticos para aliviar a inibição de crescimento da presença de 3-HP foram identificados. Especificamente, como mostrado na Figura 2, a cópia aumentada do operon *tyrA-aroF* resultou em enriquecimento significativo durante as seleções, tornando essa região genética um alvo atraente. Um clone foi cons-

truído contendo o operon *tyrA-aroF* e foi cultivado na presença de 20 g/L 3-HP. A cópia aumentada dessa região aliviou parcialmente a inibição de crescimento, conferindo um aumento de 15% no crescimento específico. Embora essa região mostre ganhos de adaptação significativos, o aumento associado na produção de tirosina e fenilalanina inibiu a primeira etapa na via de corismato. Um método para contornar esse controle inerente foi obter um mutante *aroH* resistente de retroalimentação induzível que irá aumentar a conversão de E-4-P ao mesmo tempo em que mantém a atividade na presença de grupos crescentes de produtos a jusante, desse modo, aliviando-se a inibição de crescimento devido à síntese prejudica de subprodutos necessário da via de corismato. O crescimento do mutante *aroH* na presença de 20 g/L 3-HP resultou em um aumento significativo no crescimento específico. Ademais, a concentração inibidora mínima de 24 horas de 3-HP (a concentração mínima para interromper o crescimento visível em 24 horas) em meio mínimo M9 aumentou de 25 g/L de um controle de vetor a 40g/L de um clone de *E. coli* que expressa esse mutante *aroH*. Em algumas modalidades aqui, contempla-se que o mutante *aroH* pode ser útil separadamente, ou em combinação com outras manipulações genéticas ou seleção para aumentar a tolerância de produção de 3-HP em microorganismos.

Essa inibição de crescimento descrita acima pode afetar ácidos aromáticos a jusante, tirosina, fenilalanina e triptofano. De acordo com essa inibição de crescimento, grupos aumentados desses aminoácidos reduzem a atividade das isozimas DAHPS correspondentes à primeira etapa realizada da supervia de corismato. Esse exemplo indica que a tolerância aumentada não é específica para aumentar as concentrações de cada grupo intermediário, porém pode ser obtida pela modulação dos grupos. Em um método exemplificativo, a suplementação do meio de crescimento com fenilalanina tem efeitos prejudiciais sobre o crescimento específico na presença de 3-HP enquanto a adição de tirosina tem um efeito benéfico. Isso ilustra o conceito que uma tolerância ótima de 3-HP poderia ser obtida ao modular as concentrações de produto reduzindo os grupos fenilalanina enquanto aumenta-se simultaneamente os grupos tirosina para permitir uma atividade ótima da

enzima DAHPS. Uma modalidade exemplificativa refere-se à modulação de concentrações de produto da supervia de corismato reduzindo a fenilalanina em combinação com níveis aumentados de tirosina para permitir uma atividade ótima da enzima DAHPS.

5 A Figura 4 representa a confirmação de crescimento utilizando componentes exemplificativos a jusante de corismato na supervia de corismato para reduzir a inibição de crescimento. O crescimento específico aumentado é ilustrado em preto enquanto OD₆₀₀ aumentado na culminação da fase de crescimento é ilustrado em cinza. Contempla-se aqui que um ou
10 mais produtos a jusante da supervia de corismato podem ser usados para aumentar a tolerância a 3-HP em um microorganismo. De acordo com esses usos, um ou mais produtos a jusante podem ser suplementados para culturas de microorganismos.

 A composição de 3-HP obtida, por exemplo, junto à TCI America
15 para seleções de biblioteca iniciais e todas as confirmações de crescimento subsequentes podem conter quantidades variáveis de contaminação por ácido acrílico. Uma concentração inibidora mínima de ácido acrílico para crescimento de *E. coli* Mach1 em meio mínimo foi determinada para estar em torno de 0,6 g/L. Sustentando-se que o mecanismo de tolerância específico da supervia de corismato é exclusivo para toxicidade de 3-HP, as
20 concentrações inibidoras mínimas de ácido acrílico foram determinadas para serem 0,6 g/L de *E. coli* Mach1 desenvolvida em meio mínimo suplementado com a adição de chiquimato ou homocisteína. Adicionalmente, a concentração inibidora mínima foi determinada para ser 0,6 g/L dos mutantes aroH
25 resistentes à retroalimentação desenvolvidos em meio mínimo. Esses dados sustentam que concentrações aumentadas de qualquer intermediário envolvido na supervia de corismato aumentam a tolerância específica à toxicidade de 3-HP e esse não é afetado pela contaminação por ácido acrílico de composições de 3-HP.

30 Nos exemplos descritos aqui, a adição de produtos a jusante do corismato ao meio de crescimento aumentou o crescimento específico, confirmando que a inibição do crescimento e produção de ácido orgânico pode

ocorrer devido às limitações de aminoácidos relacionados ao corismato e vitaminas essenciais. O chiquimato suplementar também causou um aumento substancial no crescimento, indicando que a inibição está ocorrendo antes do chiquimato na via de biossíntese de corismato. Estudos adicionais sugerem que a inibição ocorre entre a formação de Eritrose-4-fosfato e chiquimato. As descobertas apresentadas acima ajudam muito superar o desafio de criar uma cepa tolerante a 3-HP para uso como um hospedeiro recombinante.

Nos exemplos descritos aqui, os desafios da expressão ou adição de elementos genéticos contendo genes na supervia de corismato demonstram um crescimento específico aumentado na presença de 3-HP aumentando, desse modo, a tolerância à produção de 3-HP.

Tabela 1: Suplementação de meio e efeitos de crescimento associados comparada com controle de vetor vazio.

Suplementação	Concentração	% de Aumento de Crescimento Específico
Nenhuma	N/A	0
Tirosina	0,4 mM	9
Fenilalanina	0,4 mM	10
Triptofano	0,1 mM	1
Para-hidroxibenzoato	0,2 mM	10
Para-aminobenzoato	0,2 mM	17
2,3-di-hidroxibenzoato	0,2 mM	9
Combinação*		16
Chiquimato	0,4 mM	20
Piridoxina	2 mM	0

*Combinação inclui: tirosina, fenilalanina, para-hidroxibenzoato, para-aminobenzoato e 2,3 di-hidroxibenzoato nas concentrações acima.

Todas as COMPOSIÇÕES e/ou MÉTODOS e/ou APARELHOS descritos e reivindicados aqui podem ser feitas e executadas sem experimentação indevida em consideração com a presente descrição. Embora as composições e métodos sejam descritas em termos de modalidades preferi-

das, se tornará óbvio para os versados na técnica que variações podem ser aplicadas às COMPOSIÇÕES e/ou MÉTODOS e/ou APARELHOS e nas etapas ou na sequência de etapas dos métodos descritos aqui sem que se abandone o conceito, espírito e escopo da presente invenção. Mais especificamente, se tornará óbvio que alguns agentes que são química e fisiologicamente relacionados podem ser substituídos pelos agentes descritos aqui, embora resultados parecidos ou similares possam ser obtidos. Todos tais substitutos e modificações similares óbvios para os versados na técnica são considerados dentro do espírito, escopo e conceito como definido pelas reivindicações em anexo.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição para aumentar a tolerância ao ácido 3-hidroxi-propiónico (3-HP) por meio de um microorganismo compreendendo; um ou mais compostos capazes de modular uma supervia de corismato do micro-
5 organismo em que a modulação da supervia de corismato aumenta a tolerância de 3-HP.

2. Composição, de acordo com a reivindicação 1, em que a composição compreende um intermediário da supervia de corismato.

3. Composição, de acordo com a reivindicação 1, em que a
10 composição compreende um precursor para a supervia de corismato.

4. Composição, de acordo com a reivindicação 1, em que a composição compreende modular o fluxo através da supervia de corismato.

5. Composição, de acordo com a reivindicação 1, compreendendo ainda um composto selecionado entre um ou mais de corismato, tirosina,
15 fenilalanina, triptofano, folato, ubiquinona, meniquinona, isozimas 3-deóxi-D-arbino-heptulose-7-fosfato sintase (DAHPS), chiquimato, ou uma mistura desses.

6. Composição, de acordo com a reivindicação 1, em que o composto induz uma enzima da supervia de corismato no microorganismo.

7. Composição, de acordo com a reivindicação 1, em que o
20 composto compreende um vetor tendo um elemento genético capaz de modular a supervia de corismato.

8. Composição, de acordo com a reivindicação 2, em que a
25 composição compreende um ou mais intermediários da supervia de corismato selecionados a partir de D-Eritrose-4-fosfato, 3-deóxi-D-arabino-heptulose-7-fosfato, 3-desidroquinato, 3-desidro-chiquimato, chiquimato, chiquimato-3-fosfato, 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato, corismato, isocorismato, prefenato, fenilpiruvato, para-hidroxifenilpiruvato, L-fenilalanina, L-tirosina, 2,3-di-idro-2,3-di-hidroxibenzoato, 2,3-di-hidroxibenzoato, enterobactina, 2-succinil-6-hidróxi-2,4-ciclo-hexadieno-1-carboxilato, o-succinibenzoato, o-succinilbenzoil-coA, 1,4-di-hidróxi-2-naptoato, menaquinona, antranilato, N-(5'-fosforibosil)-antranilato, 1-(o-carboxifenilamino)-1'-desoxirribulose-5'-
30

fosfato, indol-3-glicerol-fosfato, indol, L-triptofano, 4-amino-4-deóxicorismato, para-aminobenzoato, 7,8-di-hidropteroato, 7,8-di-hidrofolato, tetra-hidrofolato, 4-hidroxibenzoato, 3-octaprenil-4-hidroxibenzoato, 2-octaprenilfenol, 2,2-octaprenil-6-hidroxifenol, 2-octaprenil-6-metóxfenol, 2-octaprenil-6-metóxi-1,4-benzoquinona, 2-octaprenil-3-metil-6-metóxil, 4-benzoquinona, 3-demetilubiquinona-8, ubiquinona-8 ou uma combinação, ou mistura de, dois ou mais desses.

9. Composição, de acordo com a reivindicação 3, em que a composição compreende um ou mais precursores da supervia de corismato selecionados entre D-Eritrose-4-fosfato, 3-deóxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato, 3-desidroquinato, 3-desidro-chiquimato, chiquimato, chiquimato-3-fosfato, 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato, corismato, isocorismato, prefenato, fenilpiruvato, para-hidroxifenilpiruvato, L-fenilalanina, L-tirosina, 2,3-di-idro-2,3-di-hidroxibenzoato, 2,3-di-hidroxibenzoato, enterobactina, 2-succinil-6-hidróxi-2,4-ciclo-hexadieno-1-carboxilato, o-succinibenzoato, o-succinilbenzoil-coA, 1,4-di-hidróxi-2-naptoato, menaquinona, antranilato, N-(5'-fosforibosil)-antranilato, 1-(o-carboxifenilamino)-1'-desoxirribulose-5'-fosfato, indol-3-glicerol-fosfato, indol, L-triptofano, 4-amino-4-desoxicorismato, para-aminobenzoato, 7,8-di-hidropteroato, 7,8-di-hidrofolato, tetra-hidrofolato, 4-hidroxibenzoato, 3-octaprenil-4-hidroxibenzoato, 2-octaprenilfenol, 2,2-octaprenil-6-hidroxifenol, 2-octaprenil-6-metóxfenol, 2-octaprenil-6-metóxi-1,4-benzoquinona, 2-octaprenil-3-metil-6-metóxi 1,4-benzoquinona, 3-demetilubiquinona-8, ubiquinona-8 ou uma combinação, ou mistura de dois ou mais desses.

10. Composição, de acordo com a reivindicação 1, em que a composição é capaz de alterar os níveis intracelulares de um ou mais intermediários da supervia de corismato selecionada a partir de D-Eritrose-4-fosfato, 3-desóxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato, 3-desidroquinato, 3-desidro-chiquimato, chiquimato, chiquimato-3-fosfato, 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato, corismato, isocorismato, prefenato, fenilpiruvato, para-hidroxifenilpiruvato, L-fenilalanina, L-tirosina, 2,3-di-idro-2,3-di-hidroxibenzoato, 2,3-di-hidroxibenzoato, enterobactina, 2-succinil-6-hidróxi-

2,4-ciclo-hexadieno-1-carboxilato, o-succinibenzoato, o-succinilbenzoil-coA, 1,4-di-hidróxi-2-naptoato, menaquinona, antranilato, N-(5'-fosforibosil)-antranilato, 1-(o-carboxifenilamino)-1'-desoxirribulose-5'-fosfato, indol-3-glicerol-fosfato, indol, L-triptofano, 4-amino-4-desoxicorismato, para-aminobenzoato, 7,8-di-hidropteroato, 7,8-di-hidrofolato, tetra-hidrofolato, 4-hidroxi-
 5 hidroxi-benzoato, 3-octaprenil-4-hidroxi-benzoato, 2-octaprenilfenol, 2,2-octaprenil-6-hidroxi-
 fenol, 2-octaprenil-6-metóxi-
 fenol, 2-octaprenil-6-metóxi-
 fenol, 1,4-benzoquinona, 2-octaprenil-3-metil-6-metóxi 1,4-benzoquinona, 3-
 demetilubiquinona-8, ubiquinona-8 ou uma combinação, ou mistura de dois
 10 ou mais desses.

11. Composição, de acordo com a reivindicação 1, em que a composição é capaz de alterar os níveis intracelulares de um ou mais pre-
 cursores da supervia de corismato selecionados a partir de D-Eritrose-4-
 fosfato, 3-desóxi-D-arabino-heptulose-7-fosfato, 3-desidroquinato, 3-
 15 desidro-chiquimato, chiquimato, chiquimato-3-fosfato, 5-enolpiruvil-
 chiquimato-3-fosfato, corismato, isocorismato, pefenato, fenilpiruvato, para-
 hidroxifenilpiruvato, L-fenilalanina, L-tirosina, 2,3-di-ido-2,3-di-
 hidroxibenzoato, 2,3-di-hidroxibenzoato, enterobactina, 2-succinil-6-hidróxi-
 2,4-ciclo-hexadieno-1-carboxilato, o-succinibenzoato, o-succinilbenzoil-coA,
 20 1,4-di-hidróxi-2-naptoato, menaquinona, antranilato, N-(5'-fosforibosil)-
 antranilato, 1-(o-carboxifenilamino)-1'-desoxirribulose-5'-fosfato, indol-3-
 glicerol-fosfato, indol, L-triptofano, 4-amino-4-desoxicorismato, para-
 aminobenzoato, 7,8-di-hidropteroato, 7,8-di-hidrofolato, tetra-hidrofolato, 4-
 hidroxi-benzoato, 3-octaprenil-4-hidroxi-benzoato, 2-octaprenilfenol, 2,2-
 25 octaprenil-6-hidroxi-
 fenol, 2-octaprenil-6-metóxi-
 fenol, 2-octaprenil-6-metóxi-
 fenol, 1,4-benzoquinona, 2-octaprenil-3-metil-6-metóxi 1,4-benzoquinona, 3-
 demetilubiquinona-8, ubiquinona-8 ou uma combinação, ou uma mistura de
 dois ou mais desses.

12. Composição, de acordo com a reivindicação 1, compreen-
 30 dendo ainda um composto selecionado a partir de um ou mais entre coris-
 mato, tirosina, fenilalanina, triptofano, folato, ubiquinona, meniquinona, iso-
 zimas 3-desóxi-D-arabino-heptulose-7-fosfato sintase (DAHPS), chiqui-

mato, D-Eritrose-4-fosfato, 3-desóxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato, 3-
 desidroquinato, 3-desidro-chiquimato, chiquimato, chiquimato-3-fosfato, 5-
 enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato, corismato, isocorismato, preferato, fenilpi-
 5 ruvato, para-hidroxifenilpiruvato, L-fenilalanina, L-tirosina, 2,3-di-idro-2,3-di-
 hidroxibenzoato, 2,3-di-hidroxibenzoato, enterobactina, 2-succinil-6-hidróxi-
 2,4-ciclo-hexadieno-1-carboxilato, o-succinibenzoato, o-succinilbenzoil-coA,
 1,4-di-hidróxi-2-naptoato, menaquinona, antranilato, N-(5'-fosforibosil)-
 antranilato, 1-(o-carboxifenilamino)- 1'-desoxirribulose-5'-fosfato, indol-3-
 glicerol-fosfato, indol, L-triptofano, 4-amino-4-desoxicorismato, para-
 10 aminobenzoato, 7,8-di-hidropteroato, 7,8-di-hidrofolato, tetra-hidrofolato, 4-
 hidroxibenzoato, 3-octaprenil-4-hidroxibenzoato, 2-octaprenilfenol, 2,2-
 octaprenil-6-hidroxifenol, 2-octaprenil-6-metóxi-1,4-benzoquinona, 2-octaprenil-3-metil-6-metóxi
 1,4-benzoquinona, 3-
 demetilubiquinona-8 ou ubiquinona-8 ou mistura desses ou combinação
 15 desses.

13. Composição, de acordo com a reivindicação 1, em que o composto modula uma enzima da supervia de corismato no microorganismo.

14. Composição, de acordo com a reivindicação 1, em que o composto compreende um vetor que possui um ou mais elementos genéti-
 20 cos capazes de alterar os metabólitos da supervia de corismato.

15. Composição, de acordo com a reivindicação 1, em que o composto induz uma alteração genética capaz de alterar os metabólitos na supervia de corismato.

16. Composição para aumentar a produção de ácido 3-
 25 hidroxipropiônico (3-HP) por meio de um microorganismo compreendendo; um ou mais compostos capazes de aumentar a tolerância do microorganism
 o a 3-HP, em que a composição induz a tolerância a pelo menos 30g/L.

17. Método para aumentar a produção ou tolerância para a produ-
 30 ção de um ácido orgânico por meio de um microorganismo compreenden-
 do, modular a supervia de corismato no microorganismo.

18. Método, de acordo com a reivindicação 17, em que a modu-
 lação da supervia de corismato no microorganismo compreende introduzir

entre ácido 3,3-dioxopropírico e ácido acrílico.

23. Método para aumentar a tolerância para a produção de um ácido orgânico por meio de um microorganismo compreendendo:

5 a) obter um ou mais compostos capazes de modular os precursores de supervias de corismato pelo microorganismo em que a indução das supervias de corismato aumenta a tolerância do ácido orgânico pelo microorganismo; e

b) introduzir os compostos em uma cultura do microorganismo.

10 24. Método, de acordo com a reivindicação 23, em que o ácido orgânico compreende uma mistura de 3-HP, e opcionalmente, um ou mais entre ácido 3,3-dioxopropírico e ácido acrílico.

15 25. Método para aumentar a produção de ácido 3-hidroxi-propíônico (3-HP) por meio de um microorganismo compreendendo colocar uma cultura de microorganismo em contato com uma composição compreendendo um ou mais compostos de supervia de corismato ou capaz de modular a supervia de corismato.

26. Método, de acordo com a reivindicação 25, em que o composto compreende um vetor que possui um ou mais elementos genéticos capazes de modular a supervia de corismato.

20 27. Método para aumentar a produção e/ou tolerância de ácido 3-hidroxi-propíônico (3-HP) por um microorganismo compreendendo manipular geneticamente as supervias de corismato no microorganismo.

25 28. Método, de acordo com a reivindicação 27, em que a manipulação genética da supervia de corismato em um microorganismo é selecionada a partir da alteração da expressão genética de um ou mais genes envolvidos na supervia de corismato em um microorganismo adicionando um vetor para introduzir um novo material genético; inserção genética, dissolução ou remoção de material genético existente; mutação de material genético ou uma combinação de dois ou mais desses.

30 29. Método, de acordo com a reivindicação 27, em que a inserção genética compreende modular os níveis intracelulares de um ou mais entre corismato, tirosina, fenilalanina, triptofano, folato, ubiquinona, meniqui-

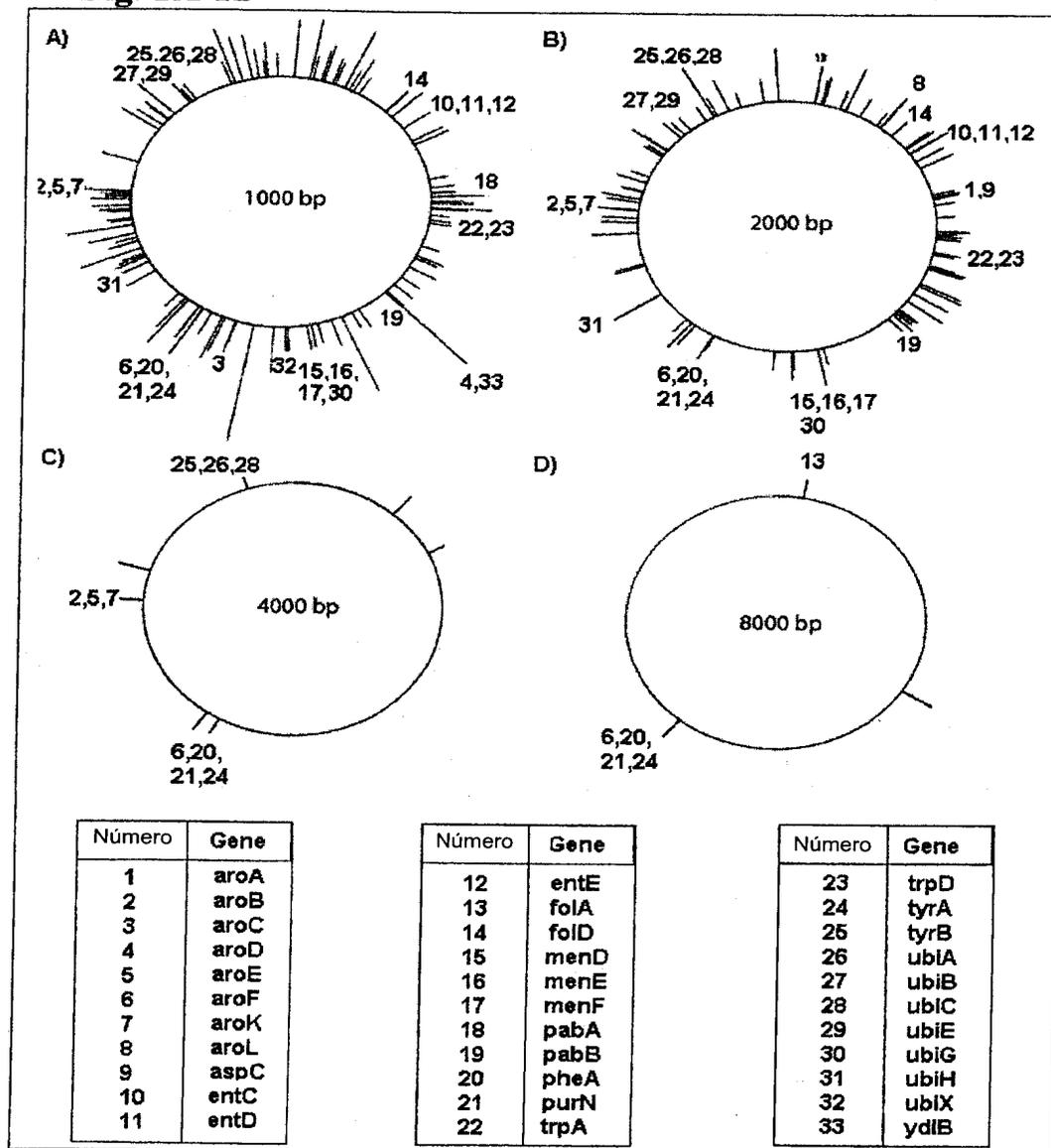
nona, isozimas 3-desóxi-D-arbino-heptulose-7-fosfato sintase (DAHPS),
 chiquimato, D-Eritrose-4-fosfato, 3-desóxi-D-arabino-heptulose-7-
 fosfato, 3-desidroquinato, 3-desidro-chiquimato, chiquimato, chiquimato-3-
 fosfato, 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato, corismato, isocorismato, prefena-
 5 to, fenilpiruvato, para-hidroxifenilpiruvato, L-fenilalanina, L-tirosina, 2,3-di-
 idro-2,3-di-hidroxibenzoato, 2,3-di-hidroxibenzoato, enterobactina, 2-succinil-
 6-hidróxi-2,4-ciclo-hexadieno-1-carboxilato, o-succinibenzoato, o-
 succinilbenzoil-coA, 1,4-di-hidróxi-2-naptoato, menaquinona, antranilato, N-
 (5'-fosforibosil)-antranilato, 1-(o-carboxifenilamino)-1'-desoxirribulose-5'-
 10 fosfato, indol-3-glicerol-fosfato, indol, L-triptofano, 4-amino-4-
 desoxicorismato, para-aminobenzoato, 7,8-di-hidropteroato, 7,8-di-idro fola-
 to, tetra-hidrofolato, 4-hidroxibenzoato, 3-octaprenil-4-hidroxibenzoato, 2-
 octaprenilfenol, 2,2-octaprenil-6-hidroxifenol, 2-octaprenil-6-metóxi-1,4-
 octaprenil-6-metóxi-1,4-benzoquinona, 2-octaprenil-3-metil-6-metóxi 1,4-
 15 benzoquinona, 3-demetilubiquinona-8, ubiquinona-8 ou uma combinação, ou
 mistura de dois ou mais desses.

30. Kit para aumentar a tolerância para a produção de um ácido
 orgânico em um microorganismo compreendendo; um ou mais compostos
 capazes de modular a supervia de corismato do microorganismo; e um ou
 20 mais recipientes, sendo que um ou mais compostos são capazes de aumen-
 tar a tolerância do ácido orgânico.

31. Kit, de acordo com a reivindicação 30, em que um ou mais
 compostos são selecionados a partir de corismato, tirosina, fenilalanina, tript-
 ofano, folato, ubiquinona, meniquinona, isozimas 3-desóxi-D-arbino-
 25 heptulose-7-fosfato sintase (DAHPS), chiquimato, D-Eritrose-4-fosfato,
 3-desóxi-D-arabino-heptulose-7-fosfato, 3-desidroquinato, 3-desidro-
 chiquimato, chiquimato, chiquimato-3-fosfato, 5-enolpiruvil-chiquimato-3-
 fosfato, corismato, isocorismato, prefenato, fenilpiruvato, para-
 hidroxifenilpiruvato, L-fenilalanina, L-tirosina, 2,3-di-idro-2,3-di-
 30 hidroxibenzoato, 2,3-di-hidroxibenzoato, enterobactina, 2-succinil-6-hidróxi-
 2,4-ciclo-hexadieno-1-carboxilato, o-succinibenzoato, o-succinilbenzoil-coA,
 1,4-di-hidróxi-2-naptoato, menaquinona, antranilato, N-(5'-fosforibosil)-

antranilato, 1-(o-carboxifenilamino)-1'-desoxirribulose-5'-fosfato, indol-3-glicerol-fosfato, indol, L-triptofano, 4-amino-4-desoxicorismato, para-aminobenzoato, 7,8-di-hidropteroato, 7,8-di-hidrofolato, tetra-hidrofolato, 4-hidroxibenzoato, 3-octaprenil-4-hidroxibenzoato, 2-octaprenilfenol, 2,2-
5 octaprenil-6-hidroxifenol, 2-octaprenil-6-metóxi-1,4-benzoquinona, 2-octaprenil-3-metil-6-metóxi-4-benzoquinona, 3-demetilubiquinona-8, ubiquinona-8 ou uma combinação, ou mistura de dois ou mais desses.

Fig. 1A-1D



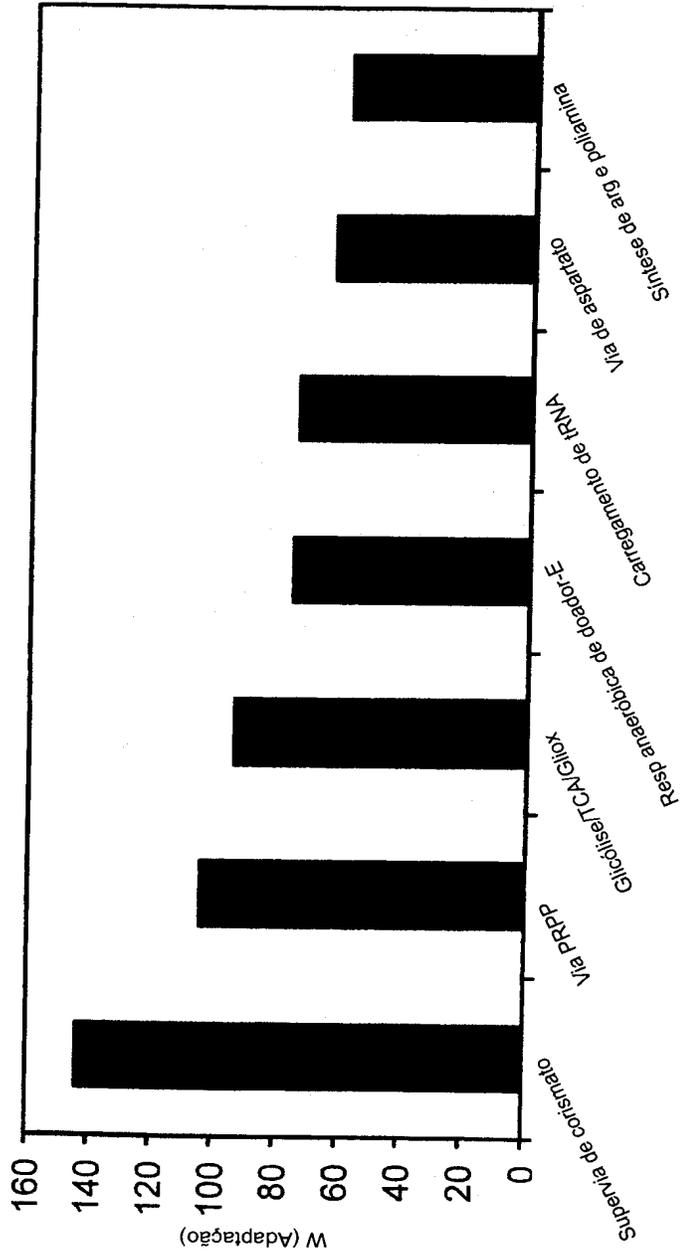


Fig. 2

Fig. 3A

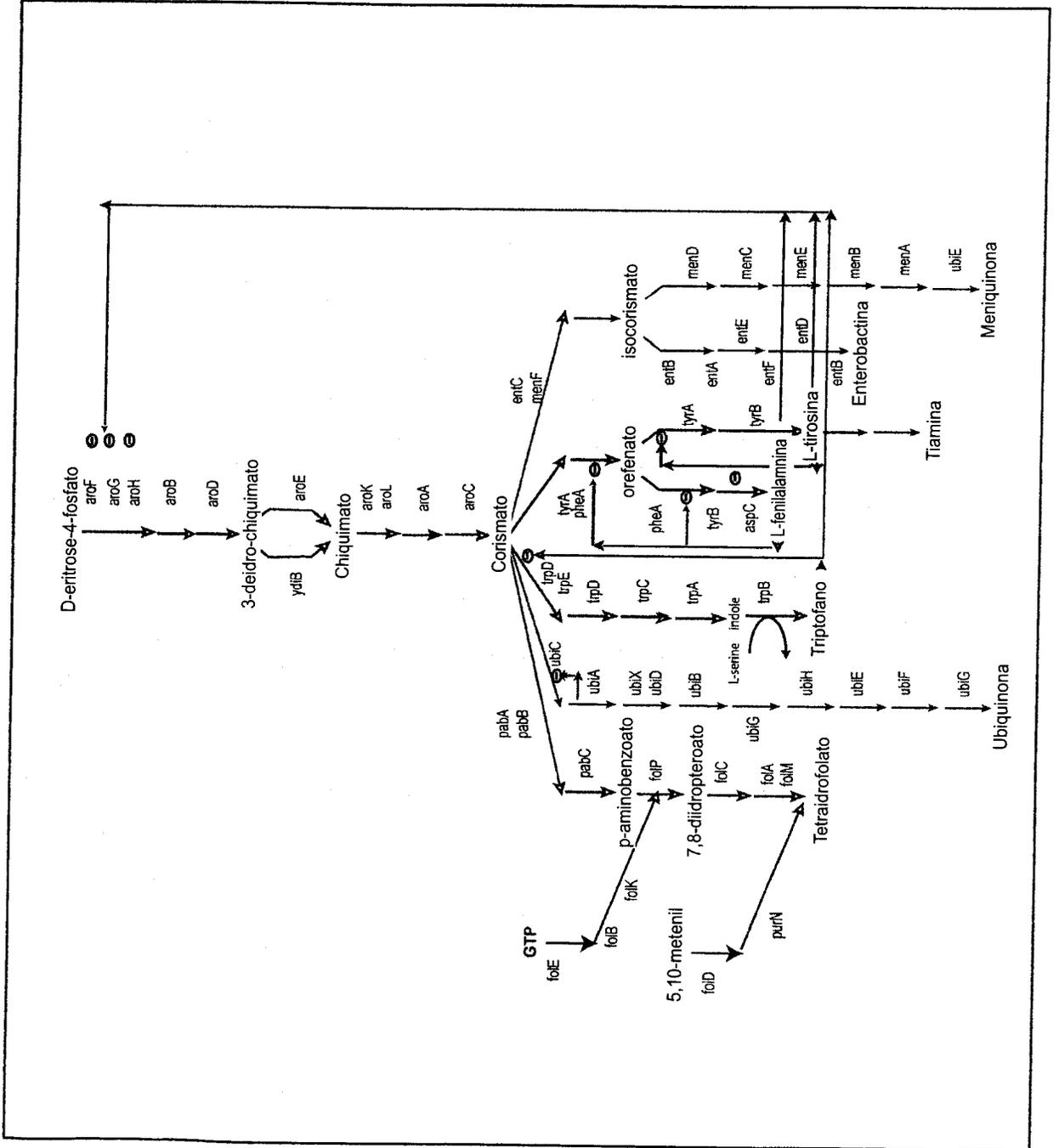


Fig. 3B

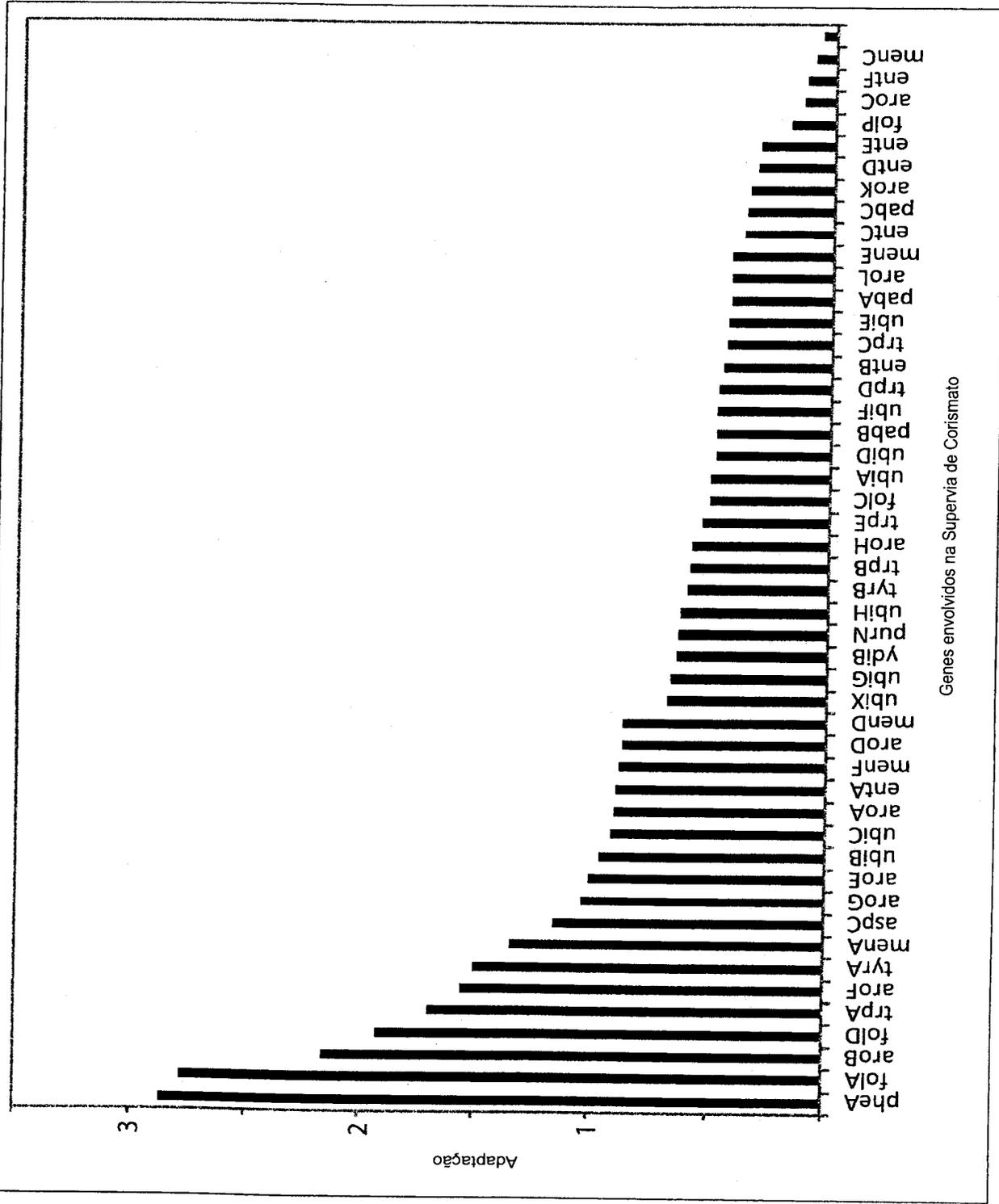
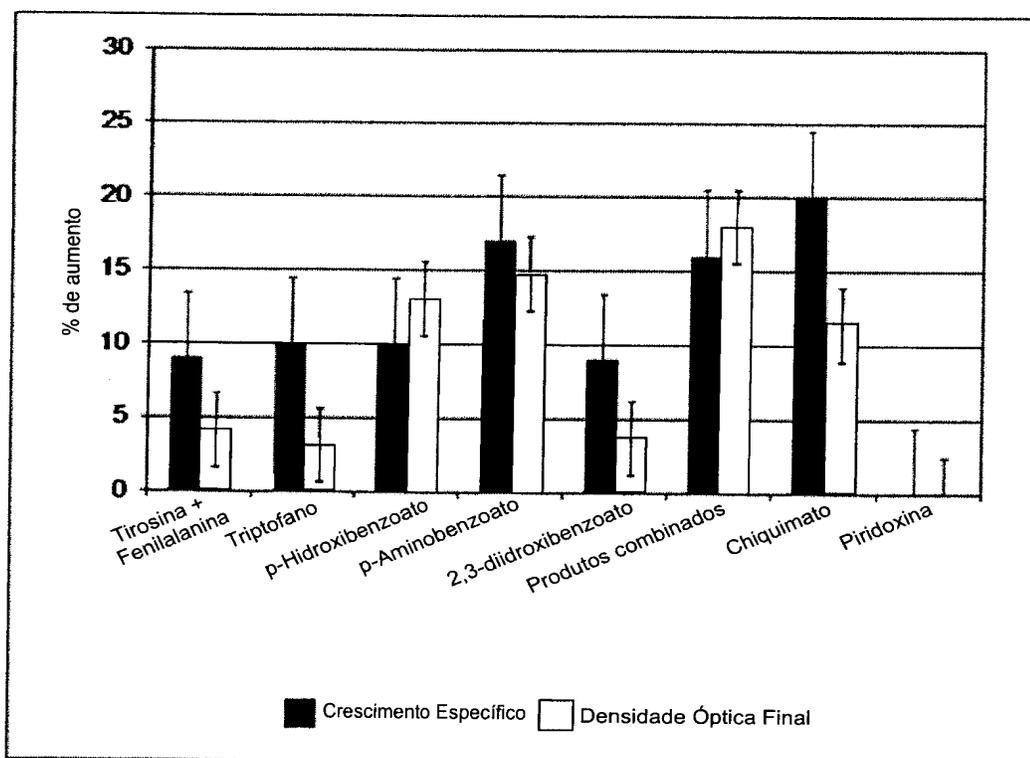


Fig. 4



RESUMO

Patente de Invenção: **"COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA AUMENTAR A TOLERÂNCIA À PRODUÇÃO DE PRODUTOS QUÍMICOS PRODUZIDOS POR MICROORGANISMOS"**.

5 A presente invenção refere-se a métodos, composições e usos para aumentar a tolerância de produção de ácidos orgânicos e álcoois por meio de microorganismos. Esse pedido refere-se geralmente a métodos, composições e usos de vetores possuindo um ou mais elementos genéticos para aumentar a tolerância de ácidos orgânicos ou álcoois por meio de um
10 microorganismo. Algumas modalidades referem-se a composições e métodos para aumentar a tolerância da produção de ácido 3-hidroxipropiônico (3-HP) por bactérias. Em algumas modalidades, as composições e métodos referem-se à regulação da expressão de uma molécula inibidora de um gene intensificador para aumentar a produção de ácido orgânico por bactérias.