

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

(21) **PI0610951-9 A2**

(22) Data de Depósito: 30/05/2006
(43) Data da Publicação: 03/08/2010
(RPI 2065)



(51) *Int.Cl.:*
C12N 1/00
C12N 15/74

(54) Título: **LEVEDURA GENETICAMENTE MODIFICADA DA ESPÉCIE ISSATCHENKIA ORIENTALIS E ESPÉCIES ESTREITAMENTE RELACIONADAS E PROCESSOS DE FERMENTAÇÃO UTILIZANDO AS MESMAS**

(57) Resumo: Células da espécie *Issatchenkia orientalis* e espécies de levedura estreitamente relacionadas são transformadas com um vetor para introduzir um gene lactato desidrogenase exógeno. As células produzem ácido láctico de modo eficaz e são resistentes a baixo pH, condições de título de lactato elevado.

(30) Prioridade Unionista: 02/06/2005 US 60/686.899

(73) Titular(es): CARGILL, INC.

(72) Inventor(es): Aristos Aristidou, Kari Koivuranta, Kevin Robert-Perez, Laura Ruohonen, Marja Ilmen, Merja Penttila, Pirkko Suominen

(74) Procurador(es): Alexandre Ferreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2006020782 de 30/05/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/032792 de 22/03/2007

"LEVEDURA GENETICAMENTE MODIFICADA DA ESPÉCIE
ISSATCHENKIA ORIENTALIS E ESPÉCIES ESTREITAMENTE RELACIO-
NADAS E PROCESSOS DE FERMENTAÇÃO UTILIZANDO AS MESMAS"

Esta invenção se deu sob o contrato nº DE-FC07-02
5 ID 14349 com o Departamento de Energia dos Estados Unidos. O
Governo dos Estados Unidos tem certos direitos sobre esta
invenção.

Este pedido reivindica benefício da Pedido de Pa-
tente Provisória US 60/686899, depositado em 2 de junho de
10 2005.

Esta invenção se refere a certas espécies de leve-
dura geneticamente modificadas.

Alguns ácidos orgânicos, como ácido lático são fa-
bricados através de um processo de fermentação industrial. A
15 fermentação é realizada utilizando vários tipos de espécies
bacterianas, que consomem açúcares (principalmente glicose)
e converter estes açúcares ao ácido desejado.

Há vários motivos pelos quais seria desejável de-
senvolver uma levedura ou fungo biocatalizador para a produ-
20 ção de açúcar a partir de substratos ácidos orgânicos. Mui-
tas bactérias são incapazes de sintetizar alguns dos aminoá-
cidos ou proteínas que necessitam para crescer e metabolizar
açúcares eficientemente. Como resultado, muitas vezes as
bactérias devem ser alimentadas com um pacote de nutrientes
25 de certo modo complexo. Isso aumenta a despesa direta neces-
sária para operar a fermentação. A crescente complexidade do
caldo faz com que seja mais difícil para recuperar o produto
de fermentação razoavelmente puro, assim os maiores custos

operacionais e de capital são necessários para recuperar o produto. Por outro lado, muitas espécies de levedura podem sintetizar seus aminoácidos ou proteínas necessárias a partir de compostos de nitrogênio inorgânico. Elas frequentemente
5 mente crescem e fermentam bem no chamado meio "definido", que são simplificados, muitas vezes menos caros e apresentam menos dificuldades nas operações de recuperação do produto.

Outra razão pela qual as leveduras são de interesse como um biocatalizador para a produção ácido orgânico tem
10 a ver com a natureza do produto em si. Para ter um processo economicamente viável, uma alta concentração do produto ácido orgânico deve se acumular na fermentação do caldo. Além das habituais preocupações de toxicidade (o produto de fermentação pode ser tóxico para o biocatalizador quando presente em concentrações elevadas), mais uma preocupação com
15 acidez existe quando a fermentação é um produto ácido. O meio se tornará cada vez mais ácido a medida que mais do ácido orgânico é produzido. A maioria das bactérias que produzem esses ácidos orgânicos não atua bem em ambientes fortemente ácidos ou não sobrevive sob essas condições ou então
20 produz o produto tão lentamente fazendo com que seja economicamente inviável.

Por este motivo, os processos comerciais de fermentação ácida são tamponados por meio da adição de um agente
25 te que neutraliza o ácido a medida que o mesmo é formado. Isto mantém o caldo a ou perto de pH neutro e permite que as bactérias cresçam e produzam de forma eficiente. No entanto,

isso converte o ácido em um sal, que posteriormente deve ser dividido para obter o produto desejado na sua forma ácida.

O agente tamponador mais comum é um composto de cálcio, que neutraliza os ácidos orgânicos para formar o correspondente sal de cálcio. Após o sal de cálcio ser recuperado a partir do caldo de fermentação, ele é dividido pela adição de um ácido mineral, normalmente ácido sulfúrico, para regenerar os ácidos orgânicos e insolúveis e formar um sal de cálcio do ácido mineral. Este processo envolve, portanto, custo direto para o agente tampão e ácido mineral, bem como os custos de tratamento e eliminação do subproduto sal de cálcio indesejado. Estes custos podem ser reduzidos ou eliminados, se o biocatalizador pudesse crescer e produzir de forma eficiente sob condições de menor pH.

Espécies de levedura têm sido consideradas como candidatas para tais baixo pH fermentações. Muitas espécies naturalmente levedura fermentar hexose açúcares ao etanol, mas poucos ou nenhuns naturalmente desejado produzir ácidos orgânicos, como ácido lático. Esforços têm sido feitos para modificar geneticamente diferentes espécies de levedura para inserir um ou mais genes que permitirão à célula produzir ácido lático. A fim de desviar o metabolismo do açúcar para produção de etanol a partir da produção de ácido lático, essas células também foram geneticamente modificadas para desnaturar ou excluir os genes nativos piruvato descarboxilase (PDC). Este trabalho é descrito, por exemplo, em WO 99/14335, WO 00/71738 A1, WO 02/42471 A2, WO 03/049525 A2, WO 03/102152 A2 e WO 03/102201A2. Grande parte dos esforços

descritos nestas diversas publicações se concentram em espécies *Kluyveromyces*, como *K. marxianus*, e certas espécies classificadas sob o gênero *Candida*, como *C. sonorensis* e *C. methanosorbosa*.

5 Resta o desejo de proporcionar ainda melhores biocatalizadores para processos de fermentação de ácido orgânico. Um biocatalizador para estes processos de fermentação pode desejavelmente atingir alta produtividade volumétrica e específica; um elevado rendimento do ácido desejado do substrato orgânico fermentação, a capacidade de crescer e produzir com eficiência razoável sob condições ácidas; e a capacidade de crescer e produzir com razoável eficiência sob condições microaeróbicas e sobretudo anaeróbicas. O biocatalizador preferivelmente pode alcançar estes resultados usando um meio simples definido. Em um aspecto, esta é uma invenção de células de levedura geneticamente modificadas de uma determinada espécie dentre *Issatehenkia orientalis*/*Pichia fermentans* clado que tenham pelo menos um gene lactato desidrogenase exógeno integrados em seu genoma.

20 Esta invenção é também um processo de fermentação no qual uma célula de levedura geneticamente modificada de primeiro aspecto é cultivada sob condições de fermentação em uma caldo de fermentação que inclui um açúcar fermentável para a produção de ácido láctico ou de um sal.

25 Esta invenção é também um processo de fermentação em que uma célula de levedura geneticamente modificada de primeiro aspecto é cultivada sob condições de fermentação em um caldo de fermentação que inclui um açúcar fermentável pa-

ra a produção de ácido láctico ou de sal, onde o pH do Caldo de fermentação durante pelo menos uma parte do período de fermentação está na faixa de entre cerca de 1,5 a cerca de 4,5.

5 Descobriu-se surpreendentemente que as células modificadas da invenção apresentam uma excelente tolerância a pH moderadamente baixo; condições de título elevado de ácido láctico, e pode crescer e produzir ácido láctico em boas taxas em um meio não tamponado, mesmo sob condições anaeróbicas ou
10 quase-anaeróbicas. Além disso, as células modificadas crescem bem no meio definido.

A Figura 1 é um diagrama ilustrando o plasmídeo pMI318.

A Figura 2 é um diagrama ilustrando o plasmídeo
15 pMI320.

A Figura 3 é um diagrama ilustrando o plasmídeo pMI321.

A Figura 4 é um diagrama ilustrando o plasmídeo pMI355.

20 A Figura 5 é um diagrama ilustrando o plasmídeo pMI356.

A Figura 6 é um diagrama ilustrando o plasmídeo pMI357.

A Figura 7 é um diagrama ilustrando o plasmídeo
25 pMI319.

A Figura 8 é um diagrama ilustrando o plasmídeo pMI433.

A Figura 9 é um diagrama ilustrando o plasmídeo pMM25.

A Figura 10 é um diagrama ilustrando o plasmídeo pMM28.

5 A Figura 11 é um diagrama ilustrando o plasmídeo pMI445.

A Figura 12 é um diagrama ilustrando o plasmídeo pMM35.

10 A Figura 13 é um diagrama ilustrando o plasmídeo pMI446.

A Figura 14 é um diagrama ilustrando o plasmídeo pMI447.

A Figura 15 é um diagrama ilustrando o plasmídeo pMI448.

15 A Figura 16 é um diagrama ilustrando o plasmídeo pMI457.

A Figura 17 é um diagrama ilustrando o plasmídeo pMI458.

20 A Figura 18 é um diagrama ilustrando plasmídeo o pMI449.

A Figura 19 é um diagrama ilustrando o plasmídeo pMI454.

A Figura 20 é um diagrama ilustrando o plasmídeo pBH165.

25 A Figura 21 é um diagrama ilustrando o plasmídeo pMI464.

A levedura geneticamente modificada da invenção é produzida através da execução de certas modificações genéti-

cas para uma célula de levedura hospedeira. A célula hospedeira é de uma espécie incluídas no grupo *I. orientalis*/*P. Fermentans* clado. Este clado é o mais terminal clado que contenha, pelo menos, as espécies *Issatchenkia orientalis*,
 5 *Pichia galeiformis*, *Pichia* sp. YB-4149 (designação NRRL), *Candida ethanolica*, *P. deserticola*, *P. membranifadens* e *P. Fermentans*. Os membros do clado *I. Orientalis*/*P. Fermentans* são identificados pela análise do domínio variável D1/D2 do DNA ribossômico 26S de espécies de levedura, utilizando o
 10 método descrito por Kurtzman e Robnett em "Identification and Phylogeny of Ascomycetous Yeasts from Analysis of Nuclear Large Subunit (26S) Ribosomal DNA Partial Sequences", *Antonie van Leeuwenhoek* 73:331- 371, 1998, incorporados neste documento por referência. Ver especialmente a pág. 349. A
 15 análise do domínio variável D1/D2 do DNA ribossômico 26S de centenas de ascomycetes revelou que o clado *I. orientalis*/*P. Fermentans* contém muitas espécies estreitamente relacionadas. Os membros do clado *I. orientalis*/*P. Fermentans* apresentam maior similaridade no domínio variável D1/D2 do DNA
 20 ribossômico 26S àquele de outros membros do clado do que àquele das espécies de levedura fora do clado. Portanto, outros membros do clado *I. orientalis*/*P. Fermentans* podem ser identificados por comparação dos domínios D1/D2 do seu respectivo DNA ribossômico e comparando àquele de outros mem-
 25 bros do clado e espécies estreitamente relacionadas fora do clado, utilizando Os métodos de Kurtzman e Robnett's.

Quando caracterizada pela primeira vez, a espécie *I. orientalis* foi atribuído o nome *Pichia kudriavzevii*. O

anamorfo (forma assexuada), de *I. orientalis* é conhecido como *Candida krusei*.

Uma célula hospedeira particularmente adequada é *I. Orientalis* cepa ATCC 32196. Outra célula hospedeira particularmente adequado é a cepa ATCC PTA-6658 de *I. orientalis*.

A célula da invenção contém pelo menos um gene lactato desidrogenase funcional e exógena (LDH) genes integrado em seu genoma. Um gene LDH é qualquer gene que codifica para uma enzima lactato desidrogenase, ou seja, um que tenha atividade de lactato desidrogenase. "Atividade de lactato desidrogenase" refere-se à capacidade das proteínas de catalisar a reação de piruvato a lactato. Enzimas lactato desidrogenase incluem (mas não estão limitadas a) aquelas classificados pela Enzyme Commission números 1.1.1.27 e 1.1.1.28.

Neste contexto, "exógeno" significa que o material genético em estudo (neste caso, o gene LDH), não é nativo para a cepa hospedeira. O termo "nativo" é usado aqui com relação ao material genético (por exemplo, um gene, promotor ou terminador), que são encontrados (além das mutações indivíduo-a-indivíduo que não afetem a função) dentro do genoma do tipo nativas de células da célula hospedeira.

O gene LDH poderá permitir que a célula modificada produza tanto o estereoisômero ácido L- como D-lático. É possível que as células modificadas da invenção contém tanto L-e D-genes LDH, e assim é capaz de produzir tanto ácido láctico estereoisômeros. No entanto, é preferido que apenas os

genes L- ou apenas D-LDH estejam presentes, de modo que a célula produza um produto ácido láctico mais opticamente puro.

Genes LDH adequados incluem aqueles obtidos a partir de fontes de bactérias, fungos, leveduras ou mamíferos. Exemplos específicos de genes L-LDH são aqueles obtidos a partir de fontes *Lactobacillus helveticus*, *L. casei*, *Bacillus megaterium*, *Pediococcus acidilactici*, *Rhizopus oryzae* e bovina, como *Bos Taurus*. Exemplos específicos de genes D-LDH são as obtidas a partir de genes de *L. helveticus*, *L. johnsonii*, *L. bulgaricus*, *L. delbrueckii*, *L. plantarum*, *L. pentosus* e *P. acidilactici*. Os genes funcionais que são idênticos a esses genes L-LDH ou D-LDH ou que têm índices de identidade de, pelo menos, 35%, 60%, 70% ou 80% em relação a tais genes no nível de aminoácido são adequados. Os genes nativos obtidos a partir de qualquer uma destas fontes podem ser submetidos a mutagênese, se necessário, para fornecer uma sequência de codificação começando com o códon de partida eucariótico habitual (ATG), ou para outros fins. Um gene preferido L-LDH é aquele que é obtido a partir de *L. helveticus* ou aquele que tem um índice de identidade relativo a tal gene de, pelo menos, 35%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% ou 95%. Outro gene L-LDH preferido é aquele que é obtido a partir de *B. megaterium* ou aquele que tem um índice de identidade de, pelo menos, 35%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% ou 95%, em comparação com esses genes. Outro gene L-LDH preferido é aquele que é obtido a partir de *Bos Taurus* ou aquele que tem um índice de identidade de, pelo menos, 35%, 60%, 70%, 80%,

85%, 90% ou 95%, em comparação com esses genes. Um gene D-LDH preferido é aquele que é obtido a partir de *L. helveticus* ou aquele que tem um índice de identidade de, pelo menos, 45%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% ou 95%, em comparação com
5 esses genes.

Os índices de identidade de seqüências de aminoácidos de DNA, RNA ou proteínas são, para efeitos da presente invenção, calculados utilizando o software BLAST versão 2.2.1 com parâmetros padrão. Genes LDH particularmente adequados incluem aqueles que codificam para uma enzima com uma
10 seqüência de aminoácidos que tem um índice de identidade de, pelo menos, 60%, sobretudo de pelo menos, 80%, 85% ou 95%, em comparação com a seqüência identificada como SEQ. ID. NO. 93 (que aparece como SEQ. ID. NO. 45 em WO 03/049525) ou
15 comparada com aquela identificada como SEQ. ID. NO. 94 (que aparece como SEQ. ID. NO. 49 em WO 03/049525). Genes LDH particularmente adequados incluem também aqueles que codificam uma enzima com uma proteína que tem uma seqüência de índice de identidades de, pelo menos, 60%, 80%, 85% ou 95%, em
20 comparação com SEQ. ID. NO. 95 ou SEQ. ID. NO. 96 (que aparecem como SEQ ID. NO. 46 e 50, respectivamente, em WO 03/049525).

A célula transformada pode conter um único gene LDH ou diversos genes LDH, tal como a partir de 1 a 10 genes
25 LDH, especialmente a partir de 1 a 5 genes LDH. Quando as células transformadas contém vários genes LDH, os genes individuais podem ser cópias dos mesmos genes, ou incluir cópias de dois ou mais genes LDH diferentes. Várias cópias de

genes LDH exógenos podem ser integrados em uma única localização (de modo que sejam adjacentes uns aos outros), ou em vários locais dentro do genoma da célula hospedeira.

Os genes LDH exógenos estão sob o controle trans-
5 cricional de um ou mais promotores e um ou mais terminais, que são funcionais na célula de levedura modificada. Conforme utilizado neste documento, o termo "promotor" refere-se a uma sequência não traduzida situada no sentido acima (ou seja, 5') em relação ao códon de início de tradução de
10 um gene estrutural (geralmente dentro de aproximadamente 1 para 1000 pb, preferivelmente 1-500 pb, especialmente 1-100 pb), que controla o início da transcrição do gene estrutural. Do mesmo modo, o termo "terminador" refere-se a uma sequência não traduzida localizado no sentido abaixo (ou seja,
15 3') em relação ao códon de término de tradução de um gene estrutural (geralmente dentro de aproximadamente 1 para 1000 pb, mais tipicamente 1-500 pares de base e especialmente 1-100 pares de base) e que controla o fim da transcrição dos genes estruturais. Um promotor ou terminador é "operati-
20 vamente ligado" a um gene estrutural se a sua posição no genoma em relação àquela do gene estrutural for tal que o promotor ou terminador, consoante o caso, desempenhe a sua função de controle transcricional.

As sequências promotoras e terminadoras podem ser
25 nativas para *I. orientalis* ou exógenas à célula. Sequências promotoras e terminadoras úteis incluem aquelas que são muito idênticos (isto é, têm um índice de identidade de 90% ou mais, especialmente 95% ou mais, a maioria preferivelmente

99% ou mais) em suas porções funcionais, em comparação com as porções funcional das seqüências promotoras e terminadoras, respectivamente, que são nativas à célula hospedeira, especialmente quando a inserção dos genes exógenos dirige-se a um local específico no genoma da célula.

Um tipo adequado de promotor tem um índice de identidade de, pelo menos, 90%, 95% ou 99% em relação a um promotor que é nativo para um gene de levedura. Um tipo mais adequado de promotor tem um índice de identidade de, pelo menos, 90%, 95% ou 99% em comparação a um gene promotor que é nativo para a célula hospedeira. Promotores particularmente úteis incluem promotores de piruvato descarboxilase (PDC) de levedura, fosfoglicerato quinase (PGK), e genes fator-1 de alongamento de transcrição (TEF-I), especialmente a partir dos respectivos genes *I. orientalis*. Um promotor especialmente útil inclui a porção funcional de um promotor de um gene PGK de *I. Orientalis*.

Um tipo adequado de terminador tem um índice de identidade de, pelo menos, 90%, 95% ou 99% em comparação com um terminador de um gene que é nativo para uma levedura. O terminador pode ter um índice de identidade de, pelo menos, 90%, 95% ou 99% homólogo a uma terminação de um gene que é nativo para a célula hospedeira. Terminadores particularmente úteis incluem terminadores de genes de piruvato descarboxilase (PDC) de levedura, xilose redutase, (XR), xilitol desidrogenase (XDH) ou iso-2-citocromo c (CYC), ou um terminador da família galactose de genes em levedura, especialmente o chamado terminador GAL10. Um terminador funcio-

nal especialmente preferido inclui uma porção de um terminador para um gene PDC da célula hospedeira.

A utilização dos promotores e terminadores nativos (para a célula hospedeira), juntamente com as respectivas
5 regiões de acompanhamento sentido acima e sentido abaixo, pode permitir a integração alvejada do gene LDH em locais específicos da célula hospedeira do genoma, e para a integração simultânea do gene LDH e supressão de um outro gene nativo, como, por exemplo, um gene PDC.

10 É possível que diferentes genes LDH exógenos estejam sob o controle de diferentes tipos de promotores e/ou terminadores.

O gene LDH exógeno pode ser integrado aleatoriamente na célula hospedeira do genoma ou inserido em um ou
15 mais locais direcionados. Exemplos de locais segmentados incluem o local de um gene que é desejavelmente suprimido ou desnaturado, como um gene PDC. A integração no local do PDC pode ser conseguida com ou sem supressão ou desnaturação do gene PDC nativo, mas é geralmente preferido desnaturar ou
20 suprimir o gene PDC, de modo que as células modificadas produzam menos etanol.

A célula hospedeira pode conter múltiplos genes PDC. As células *I. orientalis* nativas, por exemplo, contêm dois genes PDC, que aqui são designados como IoPDC1A e I-
25 oPDC1B. Em algumas cepas, incluindo ATCC PTA-6658, os mesmos são visualizados como bandas HindIII ~ 8 kbp e ~ 10 kbp, respectivamente, sob a análise Southern do organismo do tipo nativo. Outras cepas *I. orientalis*, tais como ATCC 32196,

parecem ter dois alelos que produzem bandas de dimensão semelhante. Quando a célula hospedeira contém vários genes PDC, é preferido suprimir ou desnaturar pelo menos um deles e mais preferido desnaturar todos eles, uma vez que isto destrói a capacidade da célula de produzir etanol. Assim, em *I. orientalis*, é preferido desnaturar o gene IoPDC1A ou IoPDC1B e mais preferido suprimir ou desnaturar tanto o gene IoPDC1A como o gene IoPDC1B.

Entende-se por "deletar ou desnaturar" que toda a região codificadora do gene é eliminada (deleção), ou o gene ou a sua região promotora e/ou terminadora é modificada (como por deleção, inserção, ou mutação), a fim de que o gene já não produza uma enzima ativa, ou produza uma enzima com atividade gravemente reduzida. A deleção ou desnaturação pode ser realizada por métodos de engenharia genética, evolução forçada ou mutagênese e/ou de seleção ou triagem. A forma preferida de realizar a mesma é substituir o gene PDC com uma fita contendo um gene LDH, como descritos mais detalhadamente sentido abaixo.

A modificação genética da célula hospedeira é realizada em uma ou mais etapas através da concepção e construção dos vetores adequadas e transformação da célula hospedeira com esses vetores. Os métodos de transformação por eletroporação e/ou química (como os baseados em cloreto de cálcio ou acetato de lítio) podem ser usados. Os métodos para transformar as cepas de leveduras para inserir um gene LDH exógeno são descritos em WO 99/14335, WO 00/71738, WO 02/42471, WO 03/102201, WO 03/102152 e WO 03/049525; esses

métodos são geralmente aplicáveis para transformar células *L. orientalis*, de acordo com esta invenção. Os vetores podem tanto ser cortados com enzimas de restrição especiais ou utilizados como DNA circular.

5 Em geral, um vetor é preparado de modo a conter o gene LDH associado e as seqüências promotoras e terminadoras. O vetor pode conter sítios de restrição de vários tipos de linearização ou fragmentação. Os vetores poderão igualmente incluir uma porção estrutural central (como para a
10 propagação em *E. Coli*) muitas das quais são convenientemente obtidas a partir de vetores leveduras ou bactérias comercialmente disponíveis.

O vetor preferivelmente contém uma ou mais fitas de genes marcadores de seleção. O "gene marcador de seleção"
15 é aquele que codifica uma proteína necessária para a sobrevivência e/ou crescimento das células transformadas em um meio de cultura seletivo. Genes marcadores de seleção típicos codificam proteínas que (a) conferem resistência a antibióticos ou outras substâncias tóxicas, tais como zeocina
20 (gene *sh ble* de *Streptoalloteichus hindustanus*), G418 (gene de resistência a canamicina de Tn903), higro-micina (gene de resistência aos antibióticos aminoglicosídeos de *E.coli*), Ampicilina, tetraciclina, ou canamicina); (b) complementam as deficiências auxotróficas da célula. Dois exemplos proe-
25 minentes de deficiências auxotróficas são a deficiência do aminoácido leucina (por exemplo, gene LEU2) ou deficiência de uracila (por exemplo, gene URA3). As células que são negativas para orotidina-5'-fosfato descarboxilase (*ura3-*) não

podem crescer em meios sem uracila. Assim, um gene UBA3 funcional pode ser utilizado como um marcador em uma célula com uma deficiência de uracila, e transformantes bem sucedidos podem ser selecionados em um meio sem uracila. Apenas células transformadas com o gene URA3 funcional são capazes de sintetizar uracila e crescer em tal meio. Se a cepa do tipo nativa não tiver uma deficiência de uracila (como é o caso de *I. orientalis*, por exemplo.), um mutante auxotrófico com a deficiência deve ser produzido no sentido de utilizar URA3 como um marcador de seleção para a cepa. Os métodos para a realização disto são bem conhecidos na técnica.

Os marcadores de seleção preferidos incluem o gene de resistência a zeocina, gene de resistência G418, gene de resistência higromicina e MEL5 (gene melibiase). A fita do marcador de seleção irá incluir uma sequência promotora e terminadora, operatoriamente ligada ao gene marcador de seleção, e que são acionados em *I. orientalis*. Promotores adequados incluem os descritos sentido acima com relação ao gene LDH, assim como tantas outras, como são descritos em WO 99/14335, WO 00/71738, WO 02/42471, WO 03/102201, WO 03/102152 e WO 03/049525. Um promotor especialmente preferido é um promotor PGK ou PDC (ou parte funcional do mesmo), da cepa hospedeira, ou uma sequência com um índice de identidade de, pelo menos, 80, 85, 90 ou 95%, em comparação com um tal promotor PGK ou PDC. Terminadores adequados incluem os descritos sentido acima com relação ao gene LDH. Tanto o promotor como o terminador (ou ambos) pode ser o mesmo que foi usado com o gene LDH.

A integração alvejada pode ser conseguida pela construção de um vetor com regiões que são muito idênticas a (ou seja, índices de identidade de 80% ou mais, preferivelmente 95% ou mais e mais preferivelmente 100%) para os flancos sentido acima (5'-) e sentido abaixo (3'-) do gene alvo. Uma ou ambas destas regiões podem incluir uma parte do código da região do gene alvo, bem como uma parte ou a totalidade das respectivas regiões promotoras ou terminadoras. A fita LDH (incluindo promotores e terminadores associados caso seja diferente daqueles dos genes alvo) e marcador(es) de seleção (associados com promotores e terminadores que podem ser necessários) irá residir no vetor entre as regiões que sejam muito idênticas aos flancos sentido acima e sentido abaixo do gene alvo. Como mencionado, um alvo preferido gene é o gene IoPDC1A ou IoPDC1B (ou ambos), como a desnaturação ou deleção de um ou de ambos estes genes é preferida. No entanto, outros genes nativos podem servir como metas para a inserção da fita do gene LDH.

Transformantes bem sucedidos podem ser selecionados por forma conhecida, aproveitando-se dos atributos contribuídos pelo gene marcador, ou por outras características (tais como a capacidade de produzir ácido láctico, incapacidade de produzir etanol, ou a capacidade de crescer em substratos específicos) contribuídas pelos genes introduzidos. O rastreio pode ser realizado por análise PCR ou Southern para confirmar que as inserções e deleções desejadas tenham ocorrido, para confirmar o número de cópias e para identificar o ponto de integração dos genes no genoma da cé-

lula hospedeira. A atividade da enzima codificada pelos genes inseridos e/ou a falta de atividade da enzima codificada pelo gene suprimido pode ser confirmada utilizando métodos de análise conhecidos.

5 A deleção ou desnaturação dos Genes PDC pode ser feita de diversas formas, incluindo, por exemplo, os métodos análogos aos descritos em WO 99/14335, WO 02/42471, WO 03/049525, WO 03/102152 e WO 03/102201. Em um método de particular interesse (no que diz respeito à transformação de *I.*
10 *Orientalis*), (1) as regiões de flanco 5' e 3' de um dos genes PDC de *I. orientalis* são clonadas, opcionalmente junto com uma parte do gene PDC funcional; (2) um vetor contendo as regiões de flanco 5' e 3' é produzido, e (3) a célula de *L. orientalis* é transformada com o vetor. Um evento de re-
15 combinação homólogo resulta em uma deleção do gene PDC funcional. Foi verificado que as regiões de flanco 5' e 3' para IoPDC1A podem ser usadas no vetor para suprimir ou desnaturar tanto IoPDC1A e IoPDC1B. Os métodos análogos podem ser usados para impedir ou excluir um ou mais genes PDC em ou-
20 tras células hospedeiras úteis para a invenção.

 O vetor de deleção ou desnaturação de PDC pode incluir um ou mais genes funcionais estruturais, designadamente um gene LDH como descrito sentido acima, inserido entre as porções de flanco 5' e 3' de um dos genes PDC da cé-
25 lula hospedeira. O gene funcional preferencialmente inclui seqüências funcionais promotoras e terminadoras operatoriamente ligadas ao gene estrutural. Esta abordagem permite a deleção simultânea do gene PDC e inserção dos genes funcio-

nais. O vetor pode incluir um gene marcador de seleção, em vez de ou além dos genes estruturais. Novamente, o gene marcador de seleção está posicionado sobre o vetor entre as porções de flanco 5' e 3' do gene PDC sendo alvejado, e torna-se inserido no local do gene PDC funcional. A utilização de um gene marcador de seleção tem a vantagem de introduzir uma forma de seleção para o transformantes bem sucedidos. No entanto, pode ser possível selecionar para transformantes bem sucedidos baseados nas suas capacidade reduzida ou eliminada para produzir etanol, especialmente em transformantes tendo desnaturações ou supressões de múltiplos genes PDC (tanto como os genes IoPDC1A e IoPDC1B de *I. Orientalis*).

In *I. orientalis*, é possível eliminar tanto IoPDC1A como IoPDC1B em uma única etapa, transformando a cepa hospedeira com um único vetor contendo o flanco 5' de ambos genes alvos, uma fita incluindo genes promotores e terminadores funcionais associados, e/ou uma fita genética marcador de seleção incluindo promotores e terminadores associados, e o flanco 3' de ambos os genes. Um exemplo de tal vetor é aquele designado pMI356 no Exemplo 2B. As transformações de *I. Orientalis* com um tal vetor produzem transformantes tendo um único alelo PDC deletado e transformantes tendo uma deleção de ambos os alelos IoPDC1A e IoPDC1B. Normalmente, pelo menos um dos alelos PDC é substituído por um gene LDH funcional (ou outros genes estruturais). Novamente, métodos análogos são aplicáveis em relação a outras células hospedeiras tendo múltiplos alelos PDC.

Como alternativa, é possível em *I. orientalis* suprimir IoPDC1A e IoPDC1B em um processo de duas etapas. Por exemplo, *I. orientalis* pode ser transformado com um vetor como descrito sentido acima, e cepas de deleção única de PDC transformadas uma segunda vez com um vetor similar ou análogo para eliminar o segundo alelo PDC. Os exemplos 2D e 3B sentido abaixo ilustram essa abordagem.

A célula de levedura geneticamente modificada da invenção pode incluir as modificações genéticas adicionais que fornecem alguns atributos desejados para as células. A(s) modificação(ões) adicionais de especial interesse confere à célula a capacidade de fermentar açúcares pentose a produtos de fermentação desejáveis. Entre essas modificações estão (1) inserção de um gene funcional exógeno de xilose isomerase, (2) uma deleção ou ruptura de um gene nativo que produza uma enzima que catalise a conversão de xilose para xilitol, (3) a exclusão ou desnaturação de um gene funcional de Xilitol desidrogenase e/ou (4) modificações que fazem com que a célula super-expresse uma xiluloquinase funcional. Os métodos, para a introdução de tais modificações em células de levedura são descritos, por exemplo, em WO 04/099381, incorporado neste documento por referência.

No processo de fermentação da invenção, a célula da invenção é cultivada em um meio de fermentação, que inclui um açúcar que seja fermentável pelas células transformadas. O açúcar pode ser um açúcar de hexose, como a glicose, glicano ou outros polímeros de glicose, os oligômeros de

glicose como maltose, maltotriose e isomaltotriose, panose, frutose, frutose e oligômeros. Se a célula é modificada para expandir a capacidade de fermentar açúcares de pentose, o meio de fermentação pode incluir um açúcar de pentose como a
5 xilose, xilano ou outros oligômeros de xilose. Tais açúcares de pentose são devidamente hidrolisados de uma biomassa contendo hemicelulose. Em caso de açúcares oligoméricos, pode ser necessário adicionar enzimas ao caldo de fermentação, a fim de digestão de estes açúcares correspondentes monoméri-
10 cos para a fermentação pela célula.

O meio tipicamente conterá nutrientes como exigido pela célula em particular, incluindo uma fonte de nitrogênio (como os aminoácidos, proteínas, fontes inorgânicas de nitrogênio, tais como amônia ou sais de amônio, e outras), e
15 várias vitaminas, minerais e similares. *I. Orientalis* é capaz de satisfazer as suas necessidades de nitrogênio, fósforo e magnésio a partir de fontes inorgânicas e por isso é capaz de crescer e fermentar em um meio químico definido contendo fontes inorgânicas desses elementos. Assim, as cé-
20 lulas da invenção podem ser cultivadas em tal meio químico definido. No entanto, também é possível cultivar as células da invenção em um meio de cultura complexo que não seja quimicamente definido e que possa conter fontes orgânicas de nitrogênio, tais como proteínas, proteínas parcialmente di-
25 geridas, ou aminoácidos.

Outras condições de fermentação, tais como temperatura, densidade de células, seleção de substratos, seleção de nutrientes, e similares, não são considerados como críti-

cos para a invenção e geralmente são selecionados para proporcionar um processo econômico. As temperaturas durante cada fase do crescimento e fase de produção pode variar entre a temperatura de congelamento sentido acima da média de cerca de 50 °C. A temperatura preferida, em especial durante a fase de produção, é de cerca de 30-45 °C.

Durante a fase de produção, a concentração de células do meio de fermentação é tipicamente no intervalo de aproximadamente 0,1-20, preferivelmente cerca de 0,1-5, mais preferivelmente ainda cerca de 1-3 gramas de células secas/litro de meio de fermentação.

A fermentação pode ser conduzido aeróbia, microaerobicamente ou anaerobicamente. Condições quase anaeróbicas, na qual nenhum oxigênio é adicionado durante a fermentação, mas oxigênio dissolvido está presente no meio de fermentação no início da fermentação, também pode ser usadas. Se desejado, taxas específicas de reabsorção de oxigênio podem ser usadas como um controle processo, conforme descrito em WO 03/102200. As células da invenção apresentam uma boa capacidade de fermentar açúcares de ácido lático ou misturas de ácido lático/etanol, em boas produtividades volumétricas e específicas mesmo sob condições anaeróbicas. Quando o produto de fermentação é um ácido, o meio pode ser armazenado durante a fase de produção da fermentação, a fim de que o pH seja mantido em um intervalo de cerca de 5,0 a cerca de 9,0, preferivelmente cerca de 5,5 a cerca de 7,0. Agentes tamponadores adequados são insumos básicos que neutralizam o ácido lático a medida que é formado, e incluem, por exemplo, hi-

dróxido de cálcio, carbonato de cálcio, hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, carbonato de potássio, carbonato de sódio, carbonato de amônio, amônia, hidróxido de amônio e similares. Em geral, esses agentes tamponadores que têm sido
5 usados em processos de fermentação convencionais também são adequados aqui.

Em uma fermentação tamponada, os produtos de fermentação ácida como o ácido láctico são neutralizados ao correspondente sal como elas são formadas. A recuperação do ácido
10 portanto envolve regenerar o ácido livre. Isto é normalmente feito através da eliminação das células e acidulando o caldo de fermentação com um ácido forte como o ácido sulfúrico. O sal subproduto é formado (gesso no caso onde um sal de cálcio é o agente neutralizador e o ácido sulfúrico é
15 o agente acidulante), que é separado do ácido. O ácido é então recuperado através de técnicas como a de extração líquido-líquido, destilação, absorção, etc, tal como são descritos em T.B. Vickroy, Vol. 3, capítulo 38 de Comprehensive Biotechnology, (ed. M. Moo-Young), Pergamon, Oxford, 1985;
20 R. Datta, et al., FEMS Microbiol. Rev., 1995; 16:221-231; Patente US nº 4.275.234. 4.771.001. 5.132.456. 5.420.304. 5.510.526. 5.641.406, e 5.831.122, e WO 93/00440.

É preferível, no entanto, conduzir a fermentação de modo que o pH do meio no final da fermentação seja igual
25 ou inferior a pKa do produto de fermentação ácida. Um pH final adequado está adequadamente no intervalo de cerca de 1,5 a cerca de 3,5, no intervalo de entre cerca de 1,5 a cerca de 3,0, ou na faixa de cerca de 1,5 a cerca de 2,5. O pH de

partida pode ser um pouco mais elevado, como a partir de cerca de 3,5 a cerca de 6,0, em especial a partir de cerca de 3,5 a cerca de 5,5, ou pode ser ajustado para um pH mais ácido de 1,5 a cerca de 3,5. As células desta invenção de-
5 mostraram ter uma capacidade inesperado de crescer e produzir bem mesmo em meio de fermentação ácida quando o pH é inferior a 3,5, inferior a 3,0, inferior a 2,5, e mesmo inferiores a 2,0. Descobriu-se que as células de *I. orientalis* apenas com modificações genéticas básicas, como a inserção
10 de um gene LDH e deleção de Genes IoPDC1A e IoPDC1B produzem a partir de 15-20 µg/L de ácido lático em condições anaeróbias em um meio não tamponado originalmente contendo 10 % por peso de glicose.

A recuperação de ácido lático a partir de um meio
15 de fermentação de baixo pH podem ser realizada utilizando métodos tais como os descritos no Patente US n ° 6.229.046.

O processo da invenção pode ser conduzido continuamente, em lotes, ou alguma combinação das mesmas.

Os seguintes exemplos são fornecidos para ilustrar
20 a invenção, mas não são destinados a limitar o âmbito da mesma. Todas as partes e percentagens estão em peso salvo indicação contrária.

Exemplo 1A: Clonagem de região promotora de *I. orientalis* PGK (IoPGK1); construção de um plasmídeo (pMI318, Fig. 1) com gene higromicina de *E. Coli* sob o controle do promotor IoPGK1 e de terminador *S. Cerevisiae* GAL10.
25

Um fragmento sonda 920 pb de gene PGK1 *C. sonorensis* é obtido a partir do genoma de DNA *C. sonorensis* da mesma

forma que foi descrito no Exemplo 22 de WO 02/042471, usando iniciadores identificados como SEQ. ID. NO. 1 e SEQ. ID. NO. 2. O DNA genômico é isolado a partir de uma cepa *I. Orientalis* em crescimento e ressuspensão em Tris-HCl 10 mM + EDTA 1 mM (pH 8) (TE). O DNA genômico *I. orientalis* é cortado com HindIII, e um Southern Blot é preparado e hibridizado usando métodos padrão com o gene PGK1 de *C. sonorensis* como uma sonda. Fragmentos de ~ 2 kb de tamanho são isolados a partir de gel de agarose e clonado em um Plasmídeo de corte HindIII-

10 I. A hibridização da colônia de transformantes de *E. Coli* com o sonda PGK1 resulta em isolamento de um fragmento HindIII contendo mais seqüências de proteínas que codificam PGK1 de *I. Orientalis* (IoPGK1) mas nenhuma seqüência promotora, como verificado pela seqüenciação.

15 Os fragmentos genômicos contendo a região promotora IoPGK1 são obtidas com amplificação de PCR mediada por ligação (Mueller, P.R. e Wold, B. 1989, "In vivo footprinting of a muscle specific enhancer by ligation mediated PCR." Science 246:780-786). A mistura de um ligante identificado como SEQ. ID. NO. 3 e um ligante identificado como

20 SEQ. ID. NO. 4 é ligada a DNA genômico *I. orientalis* digerida com HindIII com T4 DNA ligase (New England BioLabs). Amostras de misturas de ligação são usadas como modelos para 50 µL de reações de PCR contendo 0,1 µM de um iniciador identificado como SEQ. ID. NO. 5 e 1 de µM de um iniciador

25 identificado como SEQ. ID. NO. 6. A mistura reacional é aquecida a 94 °C durante 3 minutos depois que 2 U de Dynazyme EXT são adicionadas. As reações são 30 vezes como segue: 1

minuto a 94 °C, 2 minutos a 68 °C e 2 minutos a 72 °C, com uma última prorrogação de 10 minutos a 72 °C. A amostra diluída desta primeira amplificação PCR é usada como modelo em uma reação nested PCR (50 µL de) contendo 0,05 µM de um iniciador identificado como SEQ. ID. NO. 7 e 0,5 µM de um iniciador identificado como SEQ. ID. NO. 8. A mistura reacional é aquecida a 94 °C durante 3 minutos depois que 2 U de Dynazyme EXT é adicionado. As reações são, em seguida, cíclico 30 vezes como segue: 1 minuto a 94 °C, 2 minutos a 67 °C e 2 minutos a 72 °C, com uma última prorrogação de 10 minutos a 72 °C.

Um fragmento de PCR com ~ 600 pb é isolado e sequenciado. Iniciadores nested identificados como SEQ. ID. NO. 9 e SEQ. ID. NO. 10 são projetados e utilizados em uma amplificação de PCR mediada por ligação juntamente com oligonucleotídeos identificados como SEQ. ID. NO. 11 e SEQ. ID. NO. 12 do mesmo modo como sentido acima, exceto que o DNA de *I. orientalis* digerido é utilizado e o PCR é efetuado através de uma temperatura de anelamento de 65 °C.

O promotor *I. orientalis* PGK1 é PCR amplificado usando iniciadores identificados como SEQ. ID. NO. 13 e SEQ. ID. NO. 14 e os *I. orientalis* DNA genômico como modelo. O fragmento é preenchido utilizando a enzima Klenow e, em seguida, corte com XbaI. Um fragmento de 633 pb é isolado em gel e ligado a um fragmento de 4428 pb obtido pela digestão de um plasmídeo designado como pMI270 (descrito na Fig. 4 de WO 03/049525), com XhoI, preenchendo o fragmento no uso de enzima Klenow e dNTP 0,1 mM, e digerindo com XbaI. O plasmí-

deo pMI270 contém o gene higromicina de *E. Coli* ligado a um promotor PGK1 de *C. sonorensis* e um terminador GAL10 de *S. Cerevisiae*. O plasmídeo resultante é designado pMI318 (Fig. 1). O plasmídeo pMI318 contém o gene higromicina de *E. Coli* sob o controle do promotor PGK1 de *Z. orientalis* e do terminador GAL10 de *S. Cerevisiae*.

Exemplo 1B: Construção de um plasmídeo (pMI321, Fig 3.) Contendo o gene higromicina sob o controle do promotor IoPGK1 e do terminador GAL10 *S. Cerevisiae*, e os gene LDH de *L. helveticus* sob o controle do promotor IoPGK1 e terminador CYC1 de *S. Cerevisiae*.

O promotor PGK1 de *I. orientalis* do Exemplo IA é PCR amplificado usando iniciadores identificados como SEQ. ID. NO. 15 e SEQ. ID. NO. 16 e o DNA genômico de *I. orientalis* como modelo. O fragmento é preenchido utilizando a enzima Klenow e dNTP 0,1 mM e, em seguida, corte com NcoI. Um fragmento de 633 pb é isolado em gel.

O plasmídeo pVR1 (descrito no WO 03/102152, Figura 7), contém os genes LDH de *L. helveticus* sob o controle do promotor TEF1 de *S. Cerevisiae* e do terminador CYC1 de *S. Cerevisiae*. O plasmídeo pVR1 é digerido com XhoI, preenchido no uso de enzima Klenow, e corte com NcoI. Um fragmento de 7386 pb de plasmídeos pVR1 é ligado ao fragmento promotor IoPGK1 de 633 pb. O plasmídeo resultante é designado pMI320 (Fig. 2). O plasmídeo pMI320 contém o gene LDH de *L. helveticus* sob o controle do promotor IoPGK1 e terminador CYC1 de *S. Cerevisiae*.

Os plasmídeos pMI318 (Ex. IA, Fig. 1) e pMI320 são digeridos com Ap α I e NotI. Um fragmento de 5008 pb de plasmídeo pMI318 é ligado ao fragmento de 1995 pb de plasmídeos pMI320 para formar o plasmídeo pMI321 (Fig. 3).

5 O gene higromicina (e sua terminação) está posicionado em plasmídeo pMI321 entre duas cópias do promotor IoPGK1. Isso pode permitir a construção de uma célula transformada com plasmídeo pMI321 de se envolver em uma recombinação homóloga de "laço para fora" o gene higromicina e ter-
10 minação, juntamente com uma cópia do promotor IoPGK1.

Exemplo 1C: Geração de um mutante *I. Orientalis* (CD 990), com gene LDH integrado e gene higromicina resistente, transformando tipo nativo *I. Orientalis* com plasmídeo pMI321 parcialmente digerido (Fig. 3, Ex. IB).

15 O plasmídeo pMI321 encontra-se parcialmente restrito com XhoI, assim como a mistura resultante do DNA linear e circular é utilizada para transformar uma cepa *I. Orientalis* tipo nativa designada como ATCC PTA-6658, usando métodos padrão de acetato de lítio como descrito em Gietz et al.
20 (1992, Nucleic Acids Rs. 20:1425). As células transformadas são selecionadas para resistência a higromicina. Vários colônias higromicina resistentes são cultivadas e o meio de cultura é analisado para a produção de ácido láctico. A colônia resistente a higromicina, que produz ácido láctico é designada cepa CD990.
25

Exemplo 1D: Geração de um mutante *I. orientalis* com um gene LDH integrado e gene de resistência a higromicina

na, transformando *I. Orientalis* tipo nativa com plasmídeo pMI321 parcialmente digerido (Fig. 3, Ex. 1B).

O plasmídeo pMI321 encontra-se parcialmente restrito com XhoI, bem como a mistura resultante de DNA linear e circular é usada para transformar cepa ATCC 32196 de *I. orientalis* de tipo nativos, utilizando métodos padrão de acetato de lítio, como descrito anteriormente. As células transformadas são selecionados para resistência a higromicina. Várias colônias higromicina-resistentes são cultivadas e a cultura é analisada para a produção de ácido lático. São encontradas várias colônias que produzem ácido lático.

Exemplo 1E: Geração de um mutante *I. orientalis* com um gene LDH integrado e gene de resistência a higromicina, transformando *I. Orientalis* tipo nativa com plasmídeo pMI320 parcialmente digerido e plasmídeo pMI321 digerido (Figs. 2, 3, Ex. IB).

O plasmídeo pMI320 é parcialmente digerido com XhoI. O plasmídeo pMI321 é digerido com SmaI e SalI. Os materiais digeridos são combinados e utilizados para transformar cepa ATCC PTA-6658 de *I. orientalis* do tipo nativo, usando métodos padrão de acetato de lítio, tal como descrito anteriormente. As células transformadas são selecionados para resistência a higromicina. Várias colônias resistentes a higromicina são cultivadas e a cultura é analisada para a produção de ácido lático. são encontradas várias colônias que produzem ácido lático.

Exemplo 1F: Geração de um mutante de *I. orientalis* com um gene LDH integrado e genes resistentes a higromicina,

transformando *I. orientalis* do tipo nativo com plasmídeo pMI320 parcialmente digerido e plasmídeo pMI321 digerido (Figs 2, 3, Ex. IB).

O plasmídeo pMI320 é parcialmente digerido com XhoI. O plasmídeo pMI321 é digerido com SmaI e SalI. Os materiais digeridos são combinados e utilizados para transformar uma cepa *I. orientalis* do tipo nativo designada como ATCC 32196, utilizando métodos padrão de acetato de lítio, como descrito anteriormente. As células transformadas são selecionados para resistência a higromicina. Várias colônias resistentes a higromicina são cultivadas e a cultura é analisada para a produção de ácido lático. É encontrada uma colônia que produz ácido lático.

Exemplo 2A: Clonagem de região promotora de PDC de *I. orientalis* (IoPDC1A); construção de um plasmídeo (pMI355, Fig. 4) com o gene para higromicina de *E. Coli* sob o controle do promotor IoPGK1 e do terminador GAL10 *S. Cerevisiae*, um gene LDH de *L. helveticus* sob o controle do promotor IoPGK1 e terminador CYC1S. *Cerevisiae*, e a região de flanco 5' de IoPDC1A.

Uma biblioteca genômica da cepa nativa de *I. orientalis* ATCC PTA-6658 é construída no vetor cosmídeo Super-Cos1 (Stratagene), de acordo com instruções fornecidas pelo fabricante. seqüências similares a PDC são amplificados por PCR do DNA genômico das cepas com iniciadores designado como SEQ. ID. NO. 17 e SEQ. ID. NO. 18. Um fragmento de 700 pb de um gene PDC é amplificado. A biblioteca genômica é examinada utilizando técnicas de hibridização com fragmentos de PCR

rotulados como sondas, conforme descrito no WO 03/049525 e clones de cosmídeo contendo o gene PDC são isolados e seqüenciados. A região 5' PDC1A de *I. orientalis* de 1000 pb a 167 pb sentido acima do início do quadro de leitura aberto é PCR amplificado usando iniciadores identificados como SEQ. ID. NO. 19 e SEQ. ID. NO. 20 e os DNA de cosmídeo de PDC de *I. Orientalis* como modelo. O gene amplificado (do códon de início ao de fim), tem a seqüência identificada como SEQ. ID. NO. 97. O fragmento é cortado com SalI e SacI. Um fragmento de 836 pb é isolado em gel e ligado a um fragmento de 6992 pb obtido por digestão com plasmídeo pMI321 (Exemplo IB, Fig. 3), com SalI e SacI. O plasmídeo resultante é nomeado pMI355 (Fig. 4).

Exemplo 2B: Clonagem de região terminadora PDC (I-oPDC1A) de *I. orientalis*; construção de plasmídeos (pMIS56 e pMI357, Figs. 5 e 6) com a região de flanco 5' IoPDC1A, o gene higromicina de *E. Coli* sob o controle do promotor I-oPGK1 e do terminador GAL10 de *S. Cerevisiae*, o gene LDH de *L. helveticus* sob o controle do promotor IoPGK1 e terminador CYC1 de *S. Cerevisiae*, e a região de flanco 3' de IoPDC1A.

A região PDC 3' de *I. orientalis* correspondente às seqüências de 233 pb para 872 pb sentido abaixo do códon de parada de tradução de PDC é PCR amplificado usando iniciadores identificados como SEQ. ID. NO. 21 e SEQ. ID. NO. 22 e o DNA de cosmídeo PDC1A de *I. Orientalis* (Exemplo 2A), conforme o modelo. O fragmento é cortado com Ap α I e SmaI. Um fragmento de 630 pb é isolado em gel e ligado a 7809 pb fragmento obtido por digestão de plasmídeo pMI355 (Ex. 2A, Fig. 4),

com Ap α I e SmaI. O plasmídeo resultante é nomeado pMI356 (Fig. 5). Ele contém as fitas de plasmídeos pMI355 de higromicina e LDH entre o flanco 5' e uma parte do flanco 3' do gene IoPDC1A.

5 A região 3' PDC1A de *I. Orientalis* correspondente às seqüências de 524 pb sentido acima a 217 pb sentido abaixo do códon de parada de tradução PDC é PCR amplificada usando iniciadores identificados como SEQ. ID. NO. 23 e SEQ. ID. NO. 24 e o DNA de cosmídeo PDC de *I. Orientalis* (Exemplo 10 2A), conforme o modelo. O fragmento é cortado com Ap α I e SmaI. Um fragmento de 764 pb é isolado em gel e ligado a um fragmento de 7809 pb obtido por digestão de plasmídeo pMI355 com Ap α I e SmaI. O plasmídeo resultante é nomeado pMI357 (Fig. 6). Ele contém as fitas higromicina e LDH de plasmí- 15 deos pMI355 entre o flanco 5' e uma parte do flanco 3' do gene IoPDC1A. O plasmídeo pMI357 difere do plasmídeo pMI356 com relação à parte do flanco 3' IoPDC1A, que está presente.

Exemplo 2C: Geração de um mutante de *I. orientalis* (ATCC/357-5) com gene suprimido PDC e gene LDH integrado de 20 *L. helveticus* e gene de resistência a higromicina, transformando *I. Orientalis* tipo nativo com plasmídeo pMI357 (Fig. 6, Ex. 2B).

O plasmídeo pMI357 é restrito com SacI e Ap α I e usado para transformar cepa ATCC 32196 de *I. orientalis*, utilizando métodos químicos padrão, como descrito anteriormente. 25

As colônias que crescem sobre o meio higromicina são submetidas a análises Southern para confirmar a integra-

ção do Gene LDH do plasmídeo pMI357 e para confirmar a exclusão do alelo IoPDC1A e/ou IoPDC1B. Os transformantes contendo o gene LDH e uma deleção de um dos alelos IoPDC1A ou IoPDC1B é designado como ATCC/357-5.

5 Exemplo 2D: Geração de mutantes de *I. Orientalis*
 (CD 1027 e CD 1030) com gene PDC suprimido e gene LDH *L.*
 helveticus integrado e gene de resistência a higromicina,
 nativo, transformando *I. orientalis* tipo nativo com plasmí-
 deo pMI356 (Fig.5, Ex. 2 A).

10 O plasmídeo pMI356 é restrito com SacI e ApaI e
 utilizado para transformar a cepa ATCC PTA-6658 de *I. orient-*
 alis, usando métodos químicos padrão, como descrito anteri-

 As colônias que crescem sobre o meio de higromici-
 15 na são selecionadas. Análise Southern de DNA genômico hibri-
 dizado com LhLDH cortado com HindII-XbaI e sondas 5' PDC
 confirmam a integração do Gene LDH de plasmídeo pMI356 e a
 deleção de Gene IoPDC1B em um transformante, que é designado
 como CD 1030. Um transfor-mante tendo LDH integrado e uma
 20 deleção do gene IoPDC1A é designado como CD 1027.

Exemplo 2E: Geração de um mutante de *I. orientalis*
 (ATCC/356-23) com gene suprimido IoPDC1A e gene LDH de *L.*
 helveticus integrado e gene de resistência a higromicina,
 transformando *I. orientalis* tipo nativo com plasmídeo pMI356
 25 (Fig. 5, Ex. 2A).

 O plasmídeo pMI356 é restrito com SacI e ApaI e
 usado para transformar cepa ATCC 32196 de *I. Orientalis* tipo

nativo, utilizando métodos químicos padrão, como descrito anteriormente.

As colônias que crescem sobre o meio de higromicina são selecionadas. A análise Southern de DNA genômico hibridizado com LhLDH cortado com HindII-XbaI e sondas PDC 5' confirmam a integração do Gene LDH do plasmídeo pMI356 e a deleção de um dos alelos IoPDC1A ou IoPDC1B em um transformante, que é designado como ATCC/356-23.

Exemplo 3A: Construção de plasmídeos pMI433 (Fig. 8) contendo a região de flanco 5' IoPDC1A, o gene ScMEL5 sob o controle do promotor IoPGK1, o gene LDH de *L. helveticus* sob o controle do promotor IoPGK1 e terminador ScCYC1, e a região de flanco 3' IoPDC1A.

Um promotor *I. orientalis* PGK1 é PCR amplificado usando iniciadores identificados como SEQ. ID. NO. 25 e SEQ. ID. NO. 26 e o DNA genômico de *I. orientalis* como modelo. O fragmento é preenchido utilizando a enzima Klenow e 0,1 mM dNTP e, em seguida, corte com SphI. Um fragmento de 669 pb é isolado em gel. Um plasmídeo designado como pMI233 (descrito na Fig. 23C de WO 03/049525) é cortado com XhoI. O fragmento é preenchido com a enzima Klenow e cortado com SphI. Os fragmentos de 4534 pb e de 669 pb são ligados e o plasmídeo consequente é nomeado pMI319 (Fig. 7). O plasmídeo pMI319 contém o gene MEL5 de *S. cerevisiae* (ScMEL5) e a região promotora IoPGK1.

O plasmídeo pMI319 é cortado com ApαI, terminado com T4 polimerase, e cortado com NotI. Um fragmento de 2317 pb é isolado em gel. É ligado a um fragmento de 6498 pb ob-

tido por digestão do plasmídeo pMI357 (Exemplo 2B, Fig. 6), com SalI, terminando-se com a enzima Klenow e, em seguida, corte com NotI. O plasmídeo resultante contém o gene ScMEL5 (com o seu terminador nativo), em lugar do gene higromicina do plasmídeo pMI357. O plasmídeo resultante é designado pMI433 (Fig. 8).

Exemplo 3B: Geração de mutantes de *L. orientalis* (C258/433-3 e C258/433-4), com Genes IoPDC1A e IoPDC1B suprimidos e gene LDH de *L. helveticus* integrado e genes mutantes ScMEL5, transformando a cepa CD1027 (Ex. 2B) com plasmídeo pMI433 (Fig. 8, Ex. 3A).

A cepa mutante CD1027 é transformada com um fragmento de SacI/Ap α I de 5,9kb de plasmídeos pMI433 utilizando métodos químicos padrão. A análise Southern é realizada em transformantes que apresentam atividade melibiase, usando DNA genômico digerido com várias combinações de enzimas e realizado com sondas LhLDH e PDC 5'. Dois transformantes que perderam o alelo IoPDC1B e ganharam uma segunda cópia do gene hLDH são designados C258/433-3 e C258/433-4, respectivamente. No entanto, a integração ocorre de maneira diferente nos dois transformantes, onde a banda 3' de LhLDH correspondente à fita LhLDH do plasmídeo pMI433 aparece diferentemente nas duas cepas. Não é claro se a fita de expressão de LhLDH inserida está intacta nestes transformantes.

Exemplo 4: Geração de um mutante de *I. orientalis* (CD 1184), com alelos IoPDCJA e IoPDC1B suprimido e gene L-hLDH integrado em uma única etapa, transformando cepa *I. orientalis* tipo nativo com plasmídeo pMI356 (Fig. 5, Ex. 2B).

A cepa ATCC PTA-6658 de *I. Orientalis* é transformada com o plasmídeo pMI356 usando o método geral descrito no Exemplo 3B. As cepas transformada que crescem sobre placas de higromicina são cultivadas. Um transformante que não
5 produza etanol é selecionado para Análise Southern, o que confirma a deleção de ambas os alelos IoPDCJA e IoPDC1B e inserção de, pelo menos, uma cópia de gene LhLDH. Esta cepa é designada CD 1184.

Exemplo 5: Geração de um mutante de *I. Orientalis*
10 (CD 1270) com alelos IoPDC1A e IoPDC1B suprimidos e gene L-hLDH integrado em uma única etapa, transformando a cepa ATCC32196 do tipo nativo de *I. Orientalis* com plasmídeo pMI356 (Fig. 5, Ex. 2B).

A cepa ATCC 32196 de *I. orientalis* é transformada
15 com o plasmídeo pMI356 utilizando o método geral descrito no Exemplo 3B. As cepas transformadas que crescem sobre placas de higromicina são cultivadas. Um transformante que não produza etanol é selecionado para Análise Southern, o que confirma a deleção de ambos os alelos IoPDC1A e IoPDC1B e a in-
20 serção de uma cópia do gene LhLDH. Esta cepa é designada CD 1270.

Exemplo 6: Caracterização de cepas CD 990 (Ex. 1C)
ATCC/357-5 (Ex. 2C), ATCC 356-23 (Ex. 2E), CD1030 (Ex. 2D),
CD1184 (Ex. 4) e CD1270 (Ex. 5) em frasco de agitação mi-
25 croaeróbica em meio definido não-tamponado.

Os transformantes CD990, ATCC/357-5, ATCC 356-23, CD1030, CD1184 e CD 1270 são separadamente cultivados em 50 mL de base nitrogenada para levedura (YNB) sem aminoácidos,

complementada com 100 g/L de glicose em um frasco de Erlenmeyer de 250 mL. As culturas não são tamponadas, de modo que o pH dentro do meio caia a medida que o ácido láctico seja produzido, com um pH final de $2,0 \pm 0,1$ em cada caso. Cada
5 frasco é inoculada com um OD₆₀₀ de 0,2 com células cultivadas em placas de peptona levedura acrescidas de glicose. As culturas são mantidas a uma temperatura de 30 °C com agitação a 100 RPM. As amostras são retiradas periodicamente durante o cultivo, e OD₆₀₀ é medido. As células são recuperadas a partir
10 de cada amostra por centrifugação e o sobrenadante é analisado por HPLC para ácido láctico, glicose e etanol.

As análises HPLC são conduzidas com uma cromatografia líquida Waters 2690 Separation Module e Water System Interfase Module acoplada com um refratômetro diferencial
15 Waters 2414 e um detector de absorvância dupla λ Waters 2487. As colunas de cromatografia líquida são uma coluna Fast Juice de 50 X 7,8 mm de Phenomenex e uma coluna Fast Acid Analysis de 100 X 7,8 mm de Bio-Rad. As colunas são equilibradas com H₂SO₄ 2,5 mM em água a 60 °C e as amostras
20 são eluídas com H₂SO₄ 2,5 mM em água a taxa de fluxo de 0,5 mL/minuto. A aquisição de dados é feita usando o software Waters Millennium.

As cepas de PDC único suprimido (ATCC/357-5, ATCC/356-23 e CD 1030) produzem todas tanto etanol como ácido
25 do láctico. O consumo de glicose para essas três cepas é quase linear em todas as 168 horas de cultivo, com cada uma consumindo cerca de 50% da glicose após cerca de 72 horas e praticamente toda a glicose após cerca de 168 horas. Cada

uma dessas cepas produz cerca de 20-24 µg/L de etanol após 168 horas. A produção de ácido lático atinge o pico após cerca de 96 horas, a um nível de 15-20 µg/L para cada uma dessas cepas. As cepas a partir daí consomem uma pequena
5 quantidade de ácido lático. O rendimento de ácido lático para essas cepas atinge o pico em cerca de 35% após 48 horas, e depois cai devido ao consumo de ácido lático e produção continuada de etanol.

A cepa CD990, que não tem deleção de PDC, tem desempenho similar às cepas de PDC único suprimido.
10

As cepas de PDC duplo deletado (CD 1184 e CD 1270) produzem ácido lático, mas não etanol. Essas cepas consomem glicose mais lentamente do que fazem as outras, com cerca de 48-55% da glicose não sendo consumida após 168 horas. A cepa
15 CD 1270 produz ácido lático, através das primeiras 96 horas de cultivo, após o qual o título de ácido lático aumenta apenas ligeiramente. A cepa CD 1270 produz um pico de rendimento do ácido lático de cerca de 56%. A cepa CD 1184 continua a produzir ácido lático através de todo o período de
20 cultivo, com o título de ácido lático no final do cultivo sendo de cerca de 31 µg/L. O rendimento de ácido lático para essa cepa é de cerca de 55%.

Exemplo 7: Caracterização de cepas CD990 (Ex. 1C), CD1030 (Ex. 2D), CD1184 (Ex. 4) e CD1270 (Ex. 5) em frasco
25 de agitação em duas fases microaeróbicas, em meio definido tamponado.

Os transformantes CD 990, CD1030, CD1184 e CD1270 são separadamente cultivados em levedura peptona mais 5% de

glicose. As células são usadas para inocular frascos separados contendo YNB + 5% de glicose + 0,5 M MES, o pH 5,5 médio para $OD_{600} = 0,1$. Os balões são incubados durante a noite a 30 °C e agitação de 250 rpm. As células são então transferidas para frascos separados contendo 50 mL YNB + 10% de glicose + 4 g $CaCO_3$ a $OD_{600} = 12$, e incubadas durante 5 dias a 30 °C e agitação de 100 rpm. As amostras são retiradas periodicamente durante o cultivo, e OD_{600} é medido. As células são recuperados a partir de cada amostra por centrifugação e o sobrenadante é analisado por HPLC para ácido lático, glicose e etanol, como descrito no Exemplo 6.

A cepa CD 1030 de PDC único suprimido produz tanto etanol como ácido lático. Ela consome toda a glicose nas 48 horas e produz cerca de 56 $\mu\text{g/L}$ de ácido lático. O rendimento de ácido lático para essa cepa é ligeiramente inferior a 60%. Essa cepa também produz cerca de 13 $\mu\text{g/L}$ de etanol. Este desempenho é muito semelhante ao de CD990, que tem o gene *LhLDH* PDC sem qualquer deleção.

As cepas de PDC duplo suprimido (CD1184 e CD1270) novamente produzem ácido lático, mas não etanol. A cepa CD 1270 consome glicose ligeiramente mais rápido do que a cepa CD 1184, mas mais ou menos na mesma taxa da cepa CD 1030. O título de ácido lático da cepa CD1270 atinge o pico de cerca de 85 $\mu\text{g/L}$ após 50 horas, e diminui um pouco depois que a cepa começa a consumir ácido lático quando a glicose torna-se esgotada. O rendimento de ácido lático para esta cepa é de cerca de 85% após 50 horas. A cepa CD 1184 consome cerca de 90% da glicose após 50 horas, e consome o restante ao

longo das 72 horas seguintes. Produz um título máximo de ácido láctico de cerca de 73 µg/L e um rendimento máximo de ácido láctico de cerca de 80%.

Exemplo 8: Caracterização de cepas CD990 (Ex. 1C),
5 CD1030 (Ex. 2D), CD1184 (Ex. 4) e CD1270 (Ex. 5), em frasco
de agitação em duas fases quase anaeróbicas em meio definido
tamponado.

Transformantes CD 990, CD1030, CD1184 e CD1270 são cultivadas em levedura peptona separada mais 2% de glicose.
10 As células são usadas para inocular frascos separados contendo levedura peptona + 10% de glicose e incubados durante a noite a 30 °C e agitação de 250 rpm. As células são então transferidas para os frascos separados contendo 50 mL de levedura peptona + 10% de glicose para OD₆₀₀ = 13. Os frascos
15 são fechados com travas de água e incubados durante cerca de 6 dias a 30 °C e agitação de 100 rpm em levedura peptona + 10% de glicose. No entanto, o ar residual não é removido do espaço superior do frasco e não foram tomadas medidas para remover o oxigênio dissolvido. Estas culturas, portanto, não
20 são estritamente anaeróbicas, já que algum oxigênio encontra-se disponível, pelo menos no início do cultivo.

O pH do caldo cai para $3,2 \pm 0,1$ durante as culturas, devido à produção de ácido láctico.

As amostras são retiradas periodicamente durante o
25 cultivo, e OD₆₀₀ é medido. As células são recuperadas a partir de cada amostra por centrifugação e o sobrenadante é analisado por HPLC para ácido láctico, glicose e etanol, como descrito no Exemplo 6.

A cepa de PDC único suprimido CD 1030 produz cerca de 19 µg/L de ácido lático após 24 horas, cerca de 24 µg/L de ácido lático após 72 horas e pouco mais de 25 µg/L de ácido lático após 141 horas. A cepa CD990, que não tem dele-
5 ção de PDC, produz aproximadamente 20 µg/L de ácido lático após 24 horas e cerca de 22 µg/L de ácido lático após 141 horas. As cepas CD990 e CD 1030 tanto produzem etanol, como ácido lático.

A cepa CD 1184 de PDC duplo suprimido produz apro-
10 ximadamente 15 µg/L de ácido lático após 24 horas e aproximadamente 18 µg/L de ácido lático após 72 horas. A cepa CD 1270 de PDC duplo suprimido produz cerca de 15,5 µg/L de ácido lático após 24 horas, cerca de 14,5 µg/L de ácido láti-
co após 72 horas e cerca de 19,5 µg/L de ácido lático após
15 141 horas.

Exemplo 9A: Cultivo de cultura microaeróbica em lote da cepa CD1184 (Ex. 4) a pH 3.

Reatores de cultura em lote de etapa única dupli-
cados contendo um meio definido, que inclui sulfato de amô-
20 nio, diidrogenofosfato de potássio e sulfato de magnésio, oligoelementos, vitaminas e 83 µg/L de glicose são inocula-
dos com 1 mL de cepa CD1184. O pH do meio é ajustado para 3,3 antes da adição das células. As células são cultivadas
em 30 °C em agitação de 380 rpm e arejamento de 0,1 vvm. Es-
25 sas condições levam a uma taxa de oxigênio (ver WO 03/102200) de 2,9-3,1 mmol/L/hora. O pH da cultura é deixado
baixar para 3,0 a medida que as células crescem e começam a

produzir o ácido láctico. Em seguida, o pH é mantido em 3,0 pela adição de hidróxido de potássio.

As análises HPLC são conduzidas como descrito sentido acima. Sob essas condições, o organismo produz 67 µg/L de ácido láctico após ~ 120 horas de fermentação. A taxa de produção de lactato é de 0,62 µg/L/h, e o rendimento do lactato em glicose é de 0,76 µg/g

Exemplo 9B: Cultivo de cultura aeróbica em lote da cepa CD1184 (Ex. 4) a pH 3.

Um reator de fase única de cultura em lote contendo um meio definido, que inclui sulfato de amônio, diidrogenofosfato de potássio e sulfato de magnésio, oligoelementos, vitaminas, agente anti-espumante, e 90 µg/L de glicose é inoculado com 1 mL de cepa CD 1184. O pH do meio é ajustado para cerca de 3,3 antes de adicionar as células. O pH da cultura é deixado baixar para 3,0 a medida que as células crescem e começam a produzir ácido láctico. Em seguida, o pH é mantido a cerca de 3,0 por adição de hidróxido de potássio. As células são cultivadas em 30 °C em agitação de 490 rpm e arejamento de 0,1 vvm. Essas condições levam a uma taxa de oxigênio (ver WO 03/102200), de cerca de 8 mmol/L/h. 40 µg/L de glicose adicional são acrescentados à fermentação após cerca de 50 horas de fermentação

As análises HPLC são conduzidas como descrito sentido acima. Sob essas condições, o organismo produz 80 µg/L de ácido láctico ~ 90 horas após a fermentação (incluindo uma fase lag de cerca de 18 horas durante a qual ocorre pouca fermentação). Durante toda a fermentação do lote, a taxa de

produção de lactato é de 1,0 g/L/h, o rendimento do lactato em glicose é de 0,71 µg/g durante o período de tempo entre o fim da fase lag (18 horas) e um título de 70 µg/L de lactato é atingido (69 horas), a taxa de produção de lactato é de 1,5 g/L/h, o rendimento do lactato em glicose é de 0,75 µg/g, depois de levar em consideração os efeitos de diluição a partir da adição de glicose e hidróxido de potássio.

Exemplo 10A: Construção de um plasmídeo (pMI445, Fig. 11), contendo a fita do gene MEL5 de *S. Cerevisiae* entre repetições idênticas de *K. thermotolerans*.

A totalidade da fita do gene de *K. marxianus* CYB2 (KmCYB2), incluindo as regiões promotoras e terminadoras, é PCR amplificado do DNA genômico de uma cepa nativa de *K. marxianus*, com a introdução de sítios de restrição BamJI e SalI, por PCR usando iniciadores identificados como SEQ. ID. NO. 27 e SEQ. ID. NO. 28. O produto de PCR é ligado a um vetor comercial designado como pUC18 (de Invitrogen Corp, Carlsbad, CA), que é digerido com BamIII e SalI. O plasmídeo resultante é designado como pMM25 (Fig. 9).

A sequência de 705 pb identificada como SEQ. ID. NO. 29 é PCR amplificada do DNA genômico de *K. thermotolerans*, com a introdução de locais de restrição SphI e SalI, usando iniciadores identificados como SEQ. ID. NO. 30 e SEQ. ID. NO. 31. Esta sequência de *K. thermotolerans* não codifica para qualquer proteína ativa. O plasmídeo pMM25 é digerido com SphI e SalI e a sequência de *K. thermotolerans* é ligada a ele sentido acima (5') da fita KmCYB2 para formar um plasmídeo designado como pMM27.

Uma sequência idêntica a *K. thermotolerans* é PCR amplificada com adição de sítios de restrição BamIII e XmaI, usando iniciadores identificados como SEQ. ID. NO. 32 e SEQ. ID. NO. 33. O plasmídeo pMM27 é digerido com BamIII e XmaI e
5 a sequência de *K. thermotolerans* é ligada a ele sentido abaixo (3'), a partir da fita KmCYB2 para formar um plasmídeo designado como pMM28 (Fig. 10).

O plasmídeo pMM28 contém a fita KmCYB2 flanqueada por sequências idênticas de *K. thermotolerans*, ambas orientadas
10 na mesma direção.

O plasmídeo pMM28 é digerido com BamIII, preenchido com a enzima Klenow, e digerido com SalI. Um fragmento de 4077 pb assim obtido é ligado ao fragmento de 2317 pb obtido por digestão de pMI433 (Fig. 8, Ex. 3A), com NotI, preen-
15 chendo as saliências com a enzima Klenow, e digerindo com SalI. O plasmídeo resultante é designado pMI445 (Fig. 11).

Exemplo 10B: Isolamento de homólogos CYB2 de *I. orientalis*.

O gene KmCYB2 é usado como uma sonda para isolar
20 genes homólogos de uma biblioteca de DNA genômico obtido a partir de uma cepa de *I. orientalis* em crescimento. A sonda é sintetizada por PCR utilizando oligonucleótidos de SEQ. ID. NO. 34 e SEQ. ID. NO. 35 como iniciadores e DNA genômico de *K. marxianus* como modelo e identificados com ³²P. O gene
25 KmCYB2 assim obtido é usado para isolar genes CYB2 de *I. orientalis* de uma biblioteca genômica de *I. orientalis*. Um Southern blot contendo DNA digerido com EcoRI de seis clones de cosmídeos de *I. orientalis* e DNA genômico de uma cepa de

L. orientalis do tipo nativo são preparadas e hibridizados com o gene KmCYB2. Bandas de ~ 1,5 kbp são detectadas, isoladas em gel e clonadas em um plasmídio pBluescript SK (-) digerido com Eco.RI. As bandas são seqüenciadas usando M13 iniciadores reverso e de avanço. Os iniciadores específicos de seqüência são concebidos com base nas seqüências assim obtidas. Dois genes CYB2 são identificados, que são designados IoCYB2A e IoCYB2B. A região de codificação é aproximadamente 1 kbp das regiões de flanco 5' e 3' de cada uma das regiões de clonagem são seqüenciadas. As seqüências são identificadas como SEQ. ID. NO. 36 e SEQ. ID. NO. 37, respectivamente.

Exemplo 10C: Construção de um plasmídio (pMI447, Fig. 14), contendo o promotor *I. Orientalis* PDC1A, seqüência de *K. thermotolerans*, fita ScMEL1, segunda seqüência idêntica de *K. thermotolerans*, fita genética de LhLDH e terminador PDC1A de *I. orientalis*.

Um vetor designado como pNC16 é obtido a partir do National Energy Research Laboratories, em Golden, Colorado. Este plasmídeo contém o gene MEL1 de *S. cerevisiae* sob o controle de promotor ET de *S. Cerevisiae* e terminador GAL10 *S. cerevisiae*. A fita do gene MEL1 é PCR amplificada com adição de sítios de restrição BgIII e SacI usando iniciadores designados como SEQ. ID. NO. 38 e SEQ. ID. NO. 39. O plasmídeo pMM28 (Ex. 10A. Fig. 10) é digerido com BgIII e SacI e ligado à fita MEL1. Esta simultaneamente suprime a Fita KmCYB2 de plasmídeos pMM28 e a substitui com a fita MEL1. O plasmídio resultante é designado pMM31. Ele contém a fita

MEL1 flanqueada pelas seqüências repetidas de *K. thermotolerans*.

Uma região de flanco de ~ 2kbp diretamente 3' da região de codificação KmCYB2 é amplificada com a introdução de sítios de restrição XmaI e SacI por PCR usando iniciadores identificados como SEQ. ID. NO. 40 e SEQ. ID. NO. 41 e DNA genômico como modelo. O fragmento resultante é ligado ao plasmídeo pMM31 digerido com XmaI/SacI para inserir o flanco 3' CYB2 sentido abaixo (3') da seqüência de *K. thermotolerans* que é ela própria sentido abaixo da fita MEL1. O plasmídeo resultante é designado como pMM32.

Uma região de flanco de ~ 2kbp diretamente 5' da região de codificação KmCYB2 é amplificada com a introdução de sítios de restrição AxtII e NxrI por PCR usando iniciadores identificados como SEQ. ID. NO. 42 e SEQ. ID. NO. 43 e DNA genômico como modelo. O fragmento resultante é ligado ao plasmídeo pMM32 digerido com AxtII/NxrI. O plasmídeo resultante (designado pMM35, Fig 12.) contém, em ordem, a região de flanco 5' KmCYB2, em uma primeira seqüência idêntica de *K. thermotolerans*, a fita MEL1, a segunda seqüência idêntica de *K. thermotolerans* e a região de flanco 3' KmCYB2.

A seqüência *K. thermotolerans* é amplificada por PCR usando iniciadores identificados como SEQ. ID. NO. 44 e SEQ. ID. NO. 45, com o plasmídeo pMM35 conforme o modelo. O produto de PCR é digerido com NotI e SpeI. O fragmento resultante de 712 pb é ligado a um fragmento de 8798 pb obtido por digestão de pMI433 (Ex. 3A, Fig. 8), com SpeI e NotI. O plasmídeo resultante é designado pMI446 (Fig. 13). Ele con-

tém, na ordem, o promotor *I. orientalis* PDC, fita genética ScMEL5, a sequência *K. thermotolerans*, a fita LhLDH, e terminador PDC1A *I. orientalis*.

A sequência *K. thermotolerans* é amplificada por
 5 PCR usando iniciadores identificados como SEQ. ID. NO. 46 e
 SEQ. ID. NO. 47, utilizando plasmídeo pMM35 conforme o modelo. O produto de PCR é digerido com SalI. O fragmento resultante de 711 pb é ligado ao fragmento de 9510 pb de SalI de plasmídeos pMI446. O plasmídeo resultante é designado pMI447
 10 (Fig. 14). Ele contém, na ordem, o promotor PDC *I. orientalis*, uma primeira sequência repetida *K. thermotolerans*, fita ScMEL5, uma segunda sequência repetida *K. thermotolerans*, fita genética LhLDH e terminador PDC *I. orientalis*.

Exemplo 10D: Construção de um plasmídeo (pMI448,
 15 Fig 15.) contendo uma sequência *K. thermotolerans*, fita Sc-
MEL5 genética, segunda sequência idêntica *K. thermotolerans* e
terminador IoCYB2A.

A região de flanco 3' do gene IoCYB2A de ~ 90-676
 pb no sentido abaixo do quadro leitura aberta é amplificado
 20 por PCR usando iniciadores identificados como SEQ. ID. NO.
 48 e SEQ. ID. NO. 49 e um clone de cosmídeo contendo os genes CYB2A *I. orientalis* como modelo. O produto de PCR é digerido com SacI e SmaI. Um fragmento de 607 pb é obtido e
 ligado a um fragmento 6386 obtido por digestão de plasmídeo
 25 pMI445 (Exemplo 10A, Fig. 11), com SacI e SmaI. O plasmídeo
 resultante é designado pMI448 (Fig.15).

Exemplo 10E: Isolamento de gene URA3 da *I. Orientalis*.

Um fragmento do gene URA3 de *I. Orientalis* (IoURA3) é amplificado por PCR de DNA genômico de uma cepa nativa de *I. orientalis* usando iniciadores identificados como SEQ. ID. NO. 50 e SEQ. ID. NO. 51. Um fragmento de ~ 650 pb é obtido, o qual é ordenado para confirmar estreita homologia com o gene URA3 de outras leveduras. Este fragmento de ~ 650 pb é então usado como uma sonda para isolar o gene de comprimento máximo de uma biblioteca de cosmídeo genômica da cepa nativa de *I. orientalis*. Um clone é obtido, o qual é purificado e seqüenciado. O Clone inclui o gene funcional IoURA3 e as regiões de flanco, e inclui uma seqüência identificada como SEQ. ID. NO. 52. O quadro de leitura aberta deste gene codifica para uma proteína com 262 aminoácidos. Esta seqüência aminoacídica é identificada como SEQ. ID. NO. 53.

Exemplo 10F: Construção de plasmídeo de transformação pMI457 (Fig. 16) contendo o promotor IoURA3, fita genética ScMEL5 entre seqüências idênticas de *K. thermotolerans*, fita genética de LhLDH e terminador IoURA3 e plasmídeo de transformação pMI458 (Fig. 17) contendo o promotor IoURA3, fita ScMEL5 genética entre idêntico JL thermotolerans seqüências, e IoURA3 terminador.

A IoURA3 3'acompanhamento seqüência de /, *orientalis* é amplificado com iniciadores identificados como SEQ. ID. NO. 54 e SEQ. ID. NO. 55, com uma *I. orientalis* clone de cosmídeo contendo o gene URA3 como modelo. Um fragmento de 630 pb é obtido, que é cortado com SmaI e ApαI e ligado a um SmaI/ApαI fragmento de plasmídeos pMI447 (Ex. IOC, Fig. 14).

para produzir um plasmídeo designado pMI455. Plasmídeo pMI455 contém o *I. orientalis* PDC promotor, fita ScMEL5 genética entre repetindo *K. thermotolerans* seqüências, gene LhLDH fita e IoURA33'flanco.

5 A IoURA3 5'acompanhamento da seqüência *I. Orientalis* é amplificado com iniciadores identificados como SEQ. ID. NO. 56 e SEQ. ID. NO. 57 com o *I. Orientalis* clone de cosmídeo contendo o gene URA3 como modelo. A 554 pb fragmento é obtido, que é cortado com SphI e ligado a 6994 pb SphI-
10 corte fragmento de plasmídeos pMI448 (Ex 10C, Fig 15.) Para produzir plasmídeo pMI456. Plasmídeo pMI456 contém o promotor IoURA3, a fita genética ScMEL5 entre seqüências repetidas de *K. thermotolerans* e os *I. orientalis* terminador CYB2A.

15 O plasmídeo pMI455 é cortado com SacI e SalI. O fragmento resultante 8542 pb é ligado ao fragmento de 1264 pb SacI-XhoI de plasmídeos pMI456 para produzir o plasmídeo pMI457 (Fig. 16).

20 O plasmídeo pMI457 é cortado com NotI e SmaI, preenchido utilizando-se a enzima Klenow e o conseqüente fragmento de 7834 pb é religado para formar o plasmídeo pMI458 (Fig. 17).

Exemplo 10G: Geração de mutante de *I. orientalis* (CD 1439 e CD1440), com dois (CD1439) e uma (CD1440) cópia dos gene LhLDH e fita ScMEL5 inserida no local do gene nativo URA3 (e deleção de URA3) transformando a cepa mutante CD1184 (Ex. 4) em plasmídeos pMI457 (Ex. 10F, Fig 16) e pMI45 (Ex 10F, Fig 17)

25

A cepa mutante CD 1184 é transformada com o plasmídeo pMI457 utilizando o método geral descrito no Exemplo 3B e plaqueada em placas YPD + X- α -gal. Transformantes contendo o gene ScMEL5 são identificados com base na cor azul.

5 Aqueles transformantes são selecionados através de PCR usando iniciadores identificados como SEQ. ID. NO. 58 e SEQ. ID. NO. 59 para identificar integrantes URA3. Transformantes positivos são ainda identificados pela Análise Southern de DNA digerido com EcoRV-HindIII e NcoI-BsmI. A sonda URA3 marcada

10 com digoxigenina é sintetizada usando iniciadores identificados como SEQ. ID. NO. 56 e SEQ. ID. NO. 55 e os clone de cosmídeo contendo o gene URA3 *I. orientalis* como modelo. O transformante que produz as bandas esperadas é identificado como cepa CD 1439. A cepa CD 1439 tem o mesmo antecedente

15 genético que a cepa CD1184, exceto que ela possui uma cópia extra da fita LhLDH e fita ScMEL5 no locus de um gene nativo URA3.

A cepa CD 1440 é produzida de forma idêntica, exceto que é transformada com o plasmídeo pMI458. O plasmídeo

20 pMI458 não tem a fita LhLDH, mas por outro lado promove as mesmas transformações que o plasmídeo pMI457. As cepas CD 1439 e CD 1440, portanto, têm o mesmo antecedente genético exceto pelo número de fitas LhLDH.

Exemplo 11 - caracterização de cepas CD 1184

25 (Ex.4), CD1439 (Ex. 10F) e CD1440 (Ex. 10F) em frasco de agitação microaeróbica.

As cepas CD 1439 e CD 1440 são inoculadas separadamente, a uma primeira OD₆₀₀ de 0,15 em 50 mL de YP +100

µg/L de glicose em frascos não Erlenmeyer. Os balões são incubados a 30 °C com agitação de 100 rpm e analisados após 22, 47, 62, 91, 119 e 143 horas.

As amostras para medições de atividade enzimática (5 mL) são recolhidas periodicamente por centrifugação. Os precipitados de células são lavados com 1 mL de K_2HPO_4/KH_2PO_4 10 mM frio (pH 7,5) suplementado com EDTA 2 mM. Os precipitados lavados são ressuspensos em 1 mL do mesmo tampão e armazenados a -70 °C. As amostras são descongeladas à temperatura ambiente e lavadas em tampão de homogeneização (K_2HPO_4/KH_2PO_4 100 mM (pH 7,5) suplementado com $MgCl_2$ 2 mM, TDT 1 mM e inibidor de Protease (livre de EDTA, Roche). As amostras lavadas são ressuspensas em 0,5 mL de Tampão de homogeneização e duas vezes homogeneizadas por 30 segundos com 0,5 mL de grânulos e vidro usando um homogeneizador Bead Beater. As amostras são então centrifugadas a 14000 rpm durante 30 minutos a 4 °C. A atividade LDH é determinada analisando o sobrenadante espectrofotometricamente (A340), utilizando um analisador automatizado Cobas MIRA a 30 °C, em tampão de acetato de sódio contendo NADH 0,4 mM, frutose-1,6-difosfato 5 mM e piruvato 2 mM. 1 U de atividade é definida como a quantidade de atividade de conversão de 1 µmol de NADH para NAD^+ /minuto. As concentrações de proteína são determinadas de acordo com o método Bio-Rad, com gama-globulina bovina usada como uma proteína padrão.

Todas as cepas CD 1184, CD 1439 e CD 1440 consomem glicose aproximadamente à mesma taxa, e todas produzem aproximadamente 55-60 µg/L de lactato. Cada uma produz cerca de

0,6 g/L de piruvato e 6 µg/L de glicerol. A atividade de LDH da cepa CD 1439 é de aproximadamente 40% superior a de CD 1440 em todo o cultivo, devido à presença da segunda cópia da fita LhLDH.

5 Exemplo 12A: Clonagem de gene GPD1 de *I. Orientalis* nativa em conjunto com a região de flanco sentido acima e sentido abaixo.

Genes conhecidos de glicerol-3-fosfato-desidrogenase de várias espécies de levedura (*S. cerevisiae*, *K. marxianus*,
10 *Y. lipolytica*, *P. jadinii*, *D. hansenii* e *C. glabrata*) estão alinhados e as regiões que são altamente conservadas entre os vários genes são identificadas. Dois conjuntos de iniciadores de degeneração foram concebidos nestas regiões de alta homologia. Estes conjuntos são identificados como SEQ. ID.
15 NO. 60 e SEQ. ID. NO. 61, e SEQ. ID. NO. 62 e SEQ. ID. NO. 63, respectivamente. PCR é realizada utilizando o primeiro conjunto de iniciadores e DNA genômico de *I. orientalis* como modelo, e um produto de ~ 200 pb é obtido como esperado. PCR é realizada utilizando novamente o segundo conjunto de ini-
20 ciadores e DNA genômico de *I. orientalis* como modelo, e um produto de ~ 400 pb é obtido como esperado. Os dois produtos de PCR são purificados em gel e seqüenciados utilizando os mesmos iniciadores. Usando a seqüência parcial assim obtida, os iniciadores são projetados para o genoma walking. Genoma
25 walking é realizado utilizando o BD Clontech Genoma Walking Kit, de acordo com as instruções do fabricante utilizando iniciadores de PCR primários identificados como SEQ. ID. NO. 64 e SEQ. ID. NO. 65 e iniciadores PCR nested identificados

como SEQ. ID. NO. 66 e SEQ. ID. NO. 67. As seqüências obtidas no sentido acima e sentido abaixo do genoma walking estão alinhadas e fundidas com a seqüência parcial anteriormente obtida para construir o gene de glicerol-3-fosfatodesidrogenase de *I. orientalis*.

Exemplo 12B: Construção de plasmídeos pMI449 (Fig. 18) e pMI454 (Fig. 19) contendo região de flanco 5' CYB2 de *I. Orientalis*, fita genética ScMEL5 entre as seqüências repetidas diretas de *K. thermotolerans* e região de flanco 3' CYB2 de *I. orientalis*.

O plasmídeo pMM28 (Fig. 10, Ex. 10A) é digerido com BamHI, preenchido com a enzima Klenow, e digerido com SalI. O fragmento de 4077 pb assim obtido é ligado ao fragmento de 2317 pb NotI (preenchidos com enzima Klenow alfa)-SalI de pMI433 (Fig. 8, Ex. 3A). O plasmídeo resultante é designado pMI445.

A região de flanco 3' do gene de L-lactato:ferricitocromo c oxidoreductase (IoCYB2A) de *I. orientalis* (correspondente às seqüências de 90 a 676 pb sentido abaixo do quadro de leitura aberto previsto) é amplificado por PCR usando iniciadores identificados como SEQ. ID. NO. 68 e SEQ. ID. NO. 69, utilizando um clone de cosmídeo CYB2-2 como um modelo. O produto de PGR é digerido com SacI e SmaI e o fragmento de 607 pb é ligado ao fragmento de 6386 pb SacI-SmaI de plasmídeos pMI445. O plasmídeo resultante é designado pMI448.

A região de flanco 5' IoCYB2A (correspondente às seqüências de 913 a 487 pb sentido acima do quadro de leitura

ra aberto previsto) é amplificada por PCR usando iniciadores identificados como SEQ. ID. NO. 70 e SEQ. ID. NO. 71, novamente usando os clones de cosmídeo CYB2-2 como um modelo. O produto de PCR é digerido com SphI e os 454 pb fragmento é
 5 ligado ao fragmento de 6993 pb SphI obtido por digestão parcial de pMI448. O plasmídeo resultante é designado pMI449 (Fig. 18).

A região de flanco 5' IoCYB2A (correspondente às seqüências de 466 a 7 pb sentido acima do quadro de leitura
 10 aberto previsto) é amplificada por PCR usando iniciadores identificados como SEQ. ID. NO. 72 e SEQ. ID. NO. 73, mais uma vez usando o clone de cosmídeo CYB2-2 como modelo. O produto de PCR é digerido com SpM e o fragmento de 493 pb é
 15 ligoado ao fragmento de 6993 pb SphI obtido por digestão parcial de plasmídeo pMI448. O plasmídeo resultante é designado pMI453.

A região de flanco 3' IoCYB2A (correspondente às seqüências de 402 pb sentido acima para 77 pb sentido abaixo do códon de parada previsto) é amplificado por PCR usando
 20 iniciadores identificados como SEQ. ID. NO. 74 e SEQ. ID. NO. 75, utilizando o cosmídeo CYB2-2 como um modelo. O produto de PCR é digerido com ApaI e SmaI e o fragmento de 506 pb é ligado ao fragmento de 6886 pb ApaI-SmaI de plasmídeos pMI453. O plasmídeo resultante é designado pMI454 (Fig. 19).

25 Exemplo 12C: Construção de um plasmídeo (pBH165, Fig. 20) contendo um fragmento do gene IoGPD1 sentido acima, uma primeira seção direta repetida de *K. thermotolerans*, uma fita genética MEL5, uma segunda seção repetida direta *K.*

thermotolerans, e um fragmento do gene IoGPD1 sentido abaixo.

O plasmídeo pMI449 (1%. 18, Ex. 12B) é digerido com NdeI e SbfI para retirar a homologia do flanco 5' CYB2A. Um fragmento de 6,8 kbp é purificado em gel e desfosforilado. Um fragmento de 302 pb do gene IoGPD1 do Exemplo 12A (correspondente a 1-302 pares de base desde o códon de início do gene) é amplificado por PCR usando iniciadores identificados como SEQ. ID. NO. 76 e SEQ. ID. NO. 77. O produto de PCR é purificado em gel, digerido com NdeI e SbfI, e ligado ao fragmento de 6,8 kbp de plasmídeos pMI449 para produzir o plasmídeo pBH164. O plasmídeo pBH164 é depois digerido com XmaI e EcoRI para retirar a homologia do flanco 3' CYB2A. Um fragmento de 6,5 kbp é purificado em gel e desfosforilado. Um fragmento de 346 pb do gene IoGPD1 do Exemplo 12A (correspondente a 322-668 pares de base desde o códon de início) é amplificado por PCR usando iniciadores identificados como SEQ. ID. NO. 78 e SEQ. ID. NO. 79. O produto de PCR é purificado em gel, digerido com XmaI e EcoRI, e ligado ao fragmento de 6,5 kbp obtido a partir de pBH164 para produzir pBH165 (Fig.20).

O plasmídeo pBH165 contém, a fim de transcrição, um fragmento 302 pb do gene IoGPD1, uma primeira seção repetida direta *K. thermotolerans*, uma fita genética MEL5, uma segunda seção repetida direta *K. thermotolerans*, e o fragmento de 346 pb do gene IoGPD1s. Ele é projetado para inserção no local do gene IoGPD1s nativo (com desnaturação do gene), seguido por uma fita genética MEL5 fora da alça.

Exemplo 12D: Geração de cepa mutante de *I. orientalis* (CD1496) transformando sucessivamente a cepa CD 1184 (Ex. 4) com plasmídeos pMI449 (Ex. 12B, Fig. 18) e pMI454 (Ex. 12B, Fig 19.) seguido por mutagênese.

5 A cepa CD 1184 é transformada com o plasmídeo pMI449 utilizando o método de acetato de lítio e transformantes (colônias azuis) são selecionados com base em atividade de melibiase em placas YPD X- α -gal. A substituição do gene IoCYB2A da cepa CD 1184 é confirmada por PCR da colônia
10 e Análise Southern em alguns dos transformantes. O marcador MEL5 é retirado da alça de um desses transformantes através de um evento de recombinação homóloga de seqüências repetidas de *K. thermotolerans*, como confirmado pela Análise Southern. O segundo alelo CYB2A é então excluído deste transformante
15 usando o plasmídeo pMI454. Os transformantes são analisados por PCR de colônia para a ausência de um produto de 1000 pb de PCR específico para CYB2A. O marcador de plasmídeo pMI454 MEL5 é retirado da alça de um transformantes tendo uma deleção do segundo alelo CYB2A através da recombinação
20 como antes. Este transformante é designado cepa CD 1436. A cepa CD 1436 tem uma deleção de ambos os alelos PDC1 (com a substituição por uma fita genética funcional L-LDH), e uma exclusão de cada um dos seus dois Genes IoCYB2 nativos.

25 As células da cepa CD1436 de uma nova placa YPD são ressuspensas em 2 mL de fosfato-salina tamponada a uma OD₆₀₀ aproximada de 6. Doze alíquotas de 200 μ L desta suspensão de células são pipetadas em doze tubos com tampa de en-

caixe de 14 mL, e 8 μ L de metanosulfonato de etila (EMS, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, n° catálogo M0880, solução a 1,17g/mL) são adicionados a dez dos doze tubos. Os dois tubos restantes servem como simulação de controles tratados. Os tubos são, em seguida, incubados a 30 °C com agitação (225 rpm) durante 60 minutos, para matar 90-99% das células. Após a exposição a SME, células de doze tubos são granuladas, lavadas duas vezes com 5,0% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ a neutralizadas com EMS e depois lavadas com água. As células mutagênicas são deixadas recuperar durante 6 horas em 200 μ L de meio YP + 20g/L de glicose e, em seguida, plaqueadas em placas PDA + 35 μ g/L de ácido lático e incubadas durante uma semana a 30 °C. Uma cepa que produza mais lactato e menos glicerol do que a cepa CD 1436 é designada como cepa CD 1496.

Exemplo 12E: Transformação da cepa CD 1496 (Ex. 12D), com plasmídeo pBH165 (Ex. 12 C, Fig. 20), seguido por retirada da alça do marcador de seleção para produzir cepa CD1671 transformante, que tenha um único alelo GPD1 suprimido.

A cepa CD 1496 é cultivada e transformada com 5 μ g de fragmento 4,4 kbp obtido por digestão de plasmídeo pBH165 com NdeI e EcoRI. São selecionados transformantes em placas de base de nitrogênio para levedura (YNB) + 2% melibiose cobertas com x- α -gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-D-galactosídeo). transformantes coloridos de azul são visíveis depois de ~ 4 dias de crescimento a 30 °C. Oito transformantes são colhidos e plaqueados de colônias únicas sobre placas de YP + 20 μ g/L de glicose contendo x- α -gal. Uma única

colônia azul para cada transformante é colhida e ressemeada nas placas de YP + 20 µg/L de glicose. DNA genômico é isolado do transformante. A desnaturação de um alelo do gene IoGPD1 é verificada por PCR usando iniciadores identificados como SEQ. ID. NO. 80 e SEQ. ID. NO. 81. Um transformante que exiba ~ 2 kb do produto esperado é designado como cepa CD 1657. A desnaturação de uma cópia do gene nativo IoGPD1 é ainda confirmada por PCR usando iniciadores designados como SEQ. ID. NO. 82 e SEQ. ID. NO. 83.

10 A cepa CD 1657 é cultivada por várias rodadas em YP + 100 g/L de glicose a 30 °C. A série de diluição é plaqueada para placas YP + 20 µg/L cobertas com x-α-gal, e cresce rapidamente a 30 °C. Uma colônia branca (indicativo da fita marcadora MEL5 fora da alça) é selecionada e ressemeada para as placas YP + 20 µg/L de glicose + x-α-gal. Uma colônia branca é selecionada. A desnaturação de um alelo do gene nativo IoGPD1 é verificada por PCR usando iniciadores identificados como SEQ. ID. NO. 84 e SEQ. ID. NO. 85. Este transformante é designado como cepa CD1671.

20 Exemplo 12F: Transformação de cepas CD1671 (Ex. 12E), com plasmídeo pBH165 (Ex. 12C, Fig. 20) para produzir cepa CD1690 transformante com ambos alelos IoGPD1 suprimidos.

25 A cepa CD 1671 é transformada em 5 µg de um fragmento de 4,4 kbp obtido por digestão de plasmídeo pBH165 com transformantes NdeI e EcoRI são selecionados em placas de YNB + 2% melibiose cobertas com x-α-gal. Os transformantes coloridos de azul são visíveis depois de ~ 4 dias de cresci-

mento a 30 °C. Dez transformantes são colhidos e plaqueadas de colônias únicas sobre placas YP + 20 µg/L de glicose contendo x-α-gal. Uma única colônia azul para cada transformante é colhida e ressemeada para YP + 20 µg/L de glicose. O DNA genômico é isolado do transformante. A desnaturação do
 5 segundo alelo do gene IoGPD1 é verificada por PCR usando iniciadores identificados como SEQ. ID. NO 86 e SEQ. ID. NO. 86. Este transformante é designado como cepa CD 1690.

Exemplo 12G - Caracterização da cepa CD1690 (Ex. 12F) em frasco de agitação microaeróbica.

A cepa CD 1690 é inoculada com uma primeira OD₆₀₀ de 0,2 em YP + 100 g/L de glicose em um fermentador de lote de 3 L. Os frascos são incubados durante 40 horas a 38-40 °C com agitação de 100 rpm. O cultivo é tamponado a pH 5,5 em
 15 todo o cultivo. Sob essas condições, a cepa CD 1690 produz um rendimento de 88 gramas de ácido L-lático /100 gramas de glicose que é consumido. A produtividade de ácido L-lático é de 2,6 µg/L/h. Os rendimentos de subprodutos são CO₂: 8%; biomassa: 2,4%, e piruvato: 1%. O último OD₆₀₀ é 6,3.

Exemplo 13A: Clonagem de fragmento de gene PDC1 nativo de *P. membranifaciens*.

Um par de iniciadores de degeneração é projetado para clonar uma parte do gene PDC1 em *P. membranifaciens*. Estes iniciadores são identificados como SEQ. ID. NO. 88 e
 25 SEQ. ID. NO. 89. PCR é feita utilizando os iniciadores e DNA genômico de *P. membranifaciens* como modelo, e um produto de ~ 700 pb é obtido. O fragmento é clonado em um vetor comercial TOPO para produzir um plasmídeo designado como plasmí-

deo PDC-7 clonado. O fragmento é seqüenciado usando iniciadores identificados como SEQ. ID. NO. 90 e SEQ. ID. NO. 91. A seqüência nucleotídica do fragmento é identificada como SEQ. ID. NO. 92. O fragmento tem alta identificação com outras seqüências genéticas de PDC de leveduras conhecidas.

Exemplo 13B: Construção de plasmídeos pMI464 (Fig. 21) contendo fragmento de gene PDC1 *P. membranifaciens*, fita de expressão de higromicina e fita de expressão LhLDH.

O plasmídeo pMI357 (Fig. 6, Ex. 2B) é digerido com SacI e SalI para formar um fragmento de ~ 7735 pb. O clone de plasmídeo PDC-y é digerido com SacI e XhoI para produzir um fragmento de ~ 700 pb. Os dois fragmentos são ligados em conjunto para formar um plasmídeo designado como plasmídeo pMI464.

Exemplo 13C: Geração de cepa CD1598 pela transformação de uma cepa do tipo nativo de *P. membranifaciens* com plasmídeo pMI464 para integrar a fita genética LhLDH.

Uma cepa do tipo nativo de *P. membranifaciens* designada como NCYC2696 é transformada em um fragmento obtido por digestão de plasmídeo pMI464 com AgeI. São selecionados transformantes em placas YDP + higromicina e semeada em YDP +200 µg/mL higromicina. Uma colônia é designada como cepa CD 1598. A presença da fita genética LhLDH na cepa é verificada por PCR.

Exemplo 13D - Caracterização da cepa CD1598 (Ex. 13C) em frasco de agitação microaeróbica.

A cepa CD 1598 é inoculada com uma OD₆₀₀ inicial de 0,2 em 50 mL de meio não-tamponado YP + 10% de glicose em um

balão de agitação. O frasco é incubado durante 7 dias a 30 °C com agitação de 100 rpm. A cepa CD 1598 produz ácido láctico a um título de 47 µg/L. O rendimento de ácido láctico é de 70% baseado na glicose consumida. A taxa de produção de ácido láctico é de 0,41 µg/L/h. A cepa não produzir etanol.

1204A Lista de Seqüência.ST25

Lista de Seqüência

<110> Natureworks LLC

Suominen, Pirkko

5 Aristidou, Aristos

Penttila, Merja

Ilmen, Marja

Ruohonen, Laura

Koivuranta, Kari

10 Roberg-Perez, Kevin

<120> "LEVEDURA GENETICAMENTE MODIFICADA DA ESPÉCIE ISSATCHENKIA
ORIENTALIS E ESPÉCIES ESTREITAMENTE RELACIONADAS E PROCESSOS DE FERMEN-
TAÇÃO UTILIZANDO AS MESMAS"

<130> 1204A WO

15 <150> US 60/686,899 <151> 2005-06-02

<160> 97

<170> Patente na Versão 3.2

<210> 1

<211> 23

20 <212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Iniciador PGK

<400> 1

25 aaccaaagaa ttgttgctgc ttt

23

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador PGK.

<400> 2

5 ttcgaaaaca cctggtggac cgttc

25

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

10 <220>

<223> Iniciador de ligação

<400> 3

gcggtgaccc gggagatctg aattc

25

<210> 4

15 <211> 12

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador de ligação

20 <400> 4 gaattcagat ct

12

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

25 <220>

<223> Iniciador PCR

<400> 5

gcggtgaccc gggagatctg aattc

25

<210> 6
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 5 <220>
 <223> Iniciador PCR
 <400> 6
 ccaattctgc agcaactggc tttaacg 27
 <210> 7
 10 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Iniciador PCR Nested
 15 <400> 7
 gcggtgaccc gggagatctg aattc 27
 <210> 8
 <211> 21
 <212> DNA
 20 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Iniciador PCR Nested
 <400> 8
 gcctcaccat ttggtctgcc c 21
 25 <210> 9
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Iniciador PCR Nested
 <400> 9
 gactccccgg agtgtcgaaa tatga 25
 5 <210> 10
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 10 <223> Iniciador PCR Nested
 <400> 10
 gtgatagcgg gtcctttcgc tacc 24
 <210> 11
 <211> 25
 15 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Iniciador PCR Mediado por ligação
 <400> 11
 20 gcggtgaccc gggagatctg aattc 25
 <210> 12
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 25 <220>
 <223> Iniciador PCR Mediado por ligação
 <400> 12 gaattcagat ct 12

<210> 13

<211> 36

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

5 <220>

<223> iniciador de amplificação de promotor PGK 1

<400> 13

gcgatctcga gatttgctgc aacggcaaca tcaatg

<210> 14

10 <211> 36

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> iniciador de amplificação de promotor PGK 1

15 <400> 14

ctagcatctg attgttgctg tcgttgcttt tgcttt

36

<210> 15

<211> 36

<212> DNA

20 <213> Sequência Artificial

<220>

<223> iniciador de amplificação PGK1

<400> 15

gcgatctcga gatttgctgc aacggcaaca tcaatg

36

25 <210> 16

<211> 36

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>
 <223> iniciador de amplificação PGK1
 <400> 16
 acttggccat gggtgttggt gttgtcgttg tttttg 36
 5 <210> 17
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 10 <223> iniciador de amplificação PDC
 <400> 17
 ccggaattcg atatctgggc wggkaatgcc aaygarttra atgc 44
 <210> 18
 <211> 44
 15 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> iniciador de amplificação PDC
 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (21)-(21)
 <223> n é a, c, g, ou t
 <220>
 <221> misc_feature
 25 <222> (33)..(33)
 <223> n é a, c, g, ou t
 <400> 18
 cgcggtattca ggctctagta ngaraawgaa cngtrttra artc 44

<210> 19
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 5 <220>
 <223> iniciador de amplificação PDC
 <400> 19
 actgtcgagc tcagtatatg gaattgacgg ctcac 36
 <210> 20
 10 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> iniciador de amplificação PDC
 15 <400> 20
 actgacgcgt cgacgtatca tttgtagccc acgccacc 38
 <210> 21
 <211> 35
 <212> DNA
 20 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> iniciador de amplificação PDC de flanco 3'
 <400> 21
 cctcccccg gctgatagaa gggtgatatg taatt 35
 25 <210> 22
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador de amplificação PDC de flanco 3'

<400> 22

ccaagagtta tggggcccca gttg

24

5 <210> 23

<211> 49

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

10 <223> Iniciador de amplificação PDC de flanco 3'

<400> 23

actgacgccc cggttagtta gatagttggc taccactta ccaagagat

49

<210> 24

<211> 35

15 <212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador de amplificação PDC de flanco 3'

<400> 24

20 gggacgggcc caatagagag tgacctatcc aagct

35

<210> 25

<211> 36

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

25 <220>

<223> iniciador de amplificação de promotor PGK

<400> 25

gcgatctcga gatttgctgc aacggcaaca tcaatg

36

<210> 26

<211> 69

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

5 <220>

<223> Iniciador de amplificação de promotor PGK

<400> 26

tggactagta catgcatgcg gtgagaaagt agaaagcaaa cattgttggtt gttgttgctg 60

ttgttttttg 69

10 <210> 27

<211> 32

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

15 <223> Iniciador de amplificação para gene CYB2

<400> 27

tccccggtcg accggaactt agcttactcg tc 32

<210> 28

<211> 32

20 <212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador de amplificação para CYB2 gene

<400> 28

25 ttgcgaggat cctgagtgca gtagctgtac ac 32

<210> 29

<211> 706

<212> DNA

<213> Kluyveromyces thermotolerans

<400> 29

cactcgcaag ctgtgccatc gccaacggt taattataag aaatcaacat cagccaacaa 60
 ctattttcgt cccctcttt tcagtggtaa cgagcaatta cattagtaag agactatatt 120
 5 cttcagtgat ttgtaatttt ttttcagtga tttgtaattc tttctcgaaa tatgcgggct 180
 waamtaatcc ggacattcac tacatgcaag gaaaaacgag aaccgcggag atttcctcag 240
 taagtaacaa tgatgatctt tttacgcttc atcatcactt tccaaagttc taagctataa 300
 gttcaagcct agatacgctg aaaaactcct gaccaacaat gtaaagaaaa caattacaat 360
 tgtaagggtg aaaacatcta aaaatgaaat attttattgt acatgcacac cctgatagtc 420
 10 attctcttac ttcattccctg aaagacgtgg ctgtacaaga gttggaatcg caaggatcatg 480
 aggttaaagt tagtgatctt tatgctcaaa agtggaaggc ctcaatagac cgtgacgacw 540
 wmaaaaaama aamrmaagaa gagagggttaa aaatacccca agcttcttat gaagcgtatg 600
 ccagaggagc attaacaaaa gacgtaaadc aggaacagga aaaacttatt tgggcggact 660
 ttgtcatttt gtcgtttcct atatggtggt cttctatgcc ggctag 706

15 <210> 30

<211> 30

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

20 <223> Iniciador de amplificação para sequência K. thermotolerans

<400> 30

tgtcagcatg cactcgcaag ctgtgccatc 30

<210> 31

<211> 33

25 <212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador de amplificação para sequência K. thermotolerans.

	<400> 31	
	aaccttggtcg actagccggc atagaagacc acc	33
	<210> 32	
	<211> 30	
5	<212> DNA	
	<213> Sequência Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador de amplificação para sequência K. thermotolerans	
	<400> 32	
10	tgctcaggatc cactcgcaag ctgtgccatc	30
	<210> 33	
	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> Sequência Artificial	
15	<220>	
	<223> Iniciador de amplificação para sequência K. thermotolerans	
	<400> 33	
	aaccttcccg ggtagccggc atagaagacc acc	33
	<210> 34	
20	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Sequência Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador de amplificação para gene CYB2	
25	<400> 34	
	ctggatctac agcattctc	20
	<210> 35	
	<211> 20	

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador de amplificação para gene CYB2

5 <400> 35

tgtaccggct gtccttaaac

20

<210> 36

<211> 4160

<212> DNA

10 <213> Issatchenkia orientalis

<220>

<221> misc_feature

<222> (609)..(609)

<223> n é a, c, g, ou t

15 <220>

<221> misc_feature

<222> (770)..(770)

<223> n é a, c, g, ou t

<220>

20 <221> misc_feature

<222> (949)..(949)

<223> n é a, c, g, ou t

<220>

<221> misc_feature

25 <222> (1592)..(1592)

<223> n é a, c, g, ou t

<220>

<221> misc_feature

<222> (3716)..(3716)

<223> n é a, c, g, ou t

<220>

<221> misc_feature

5 <222> (3849)..(3849)

<223> n é a, c, g, ou t

<220>

<221> misc_feature

<222> (3903)..(3903)

10 <223> n é a, c, g, ou t

<400> 36

tcaaatagta tctcattgta tactaagata gtttgtatTT gtgtgtgtgt gtcagtgtaa 60

gtgttagtat acttgTTTT ctctttcccc tagagtTgt ggtgtgtttt gttggaacgt 120

acattagatg cataatgcgt gacaccgcca tgatggtTgt attctaccaa tgagacatgg 180

15 ccgctgatcc tgttTgtTgg gTcatgggac atcacctctt gggggggatt ctctataat 240

tggcaccgtg tatgcctcaa ccactaactt ccaccctata actgaatata ttacataagc 300

aaatctactt tttgtttTgt ttgatcgcca tcgttgaaat tcgcgcaact tctggTggct 360

caacgctgct gttctatcgg tatcctaaga gatgtctttg ccctgagtct agggtaaact 420

atccaccttc gttgctgttt gactagacag ctactaactt tacggtagta aatgaataac 480

20 ggctcgctct catgatcact tctctacatc accctaacaa gtgtattatt tttttttcag 540

gtgggtgttg ctgttggtgc tagccttagt gccctcgta atagttgaac aaacactggc 600

atttgagna taatgaaaag ggatcactac ccccgcttc ctgttccgct tctcccttcc 660

ggaaaaacca cccacccttt cttttcccc actaatgtat gaatttttcc gttcccaggg 720

gaatggccca cttggttctc tgtaaacca cacaattttg acgcatccn cacacctttt 780

25 ttttttcata cccacactt tcccttgaaa atctccaatt tgaactggca atttcacccc 840

cccaccactt gcattcatta gtgagtcaat ccatccccgc ggtcggagat tcggaatcca 900

cctactggta atctgtaatc tatattcccg ctgacccttt ataaatganc tattgtcgtc 960

aattgcggta gtgctccaac aaattgtaag gaccttcttt aaccttttcg attcaatcca 1020

	tctccacata aacctagttg cacacaatgt tactcagatc actaaactct tctgctcggt	1080
	gtgtcaaaca aacaaccaga acaaaggtta ggtatctcag ccacgtcagt ggtgcaagca	1140
	tggcgaaacc tacattgaag aacaactoga gagaatccaa caaatccaga aactatctaa	1200
	ttgctgctgt gacagcattg gctgtatcaa cctcaattgg agttgccgta catgtgaagg	1260
5	acccttgta taâcgaatgct accggcagtg attctccgag aagtatatct gttgacgagt	1320
	ttgtcaagca taattcacia aacgactggt ggattgcaat caatggcaag gtttatgatt	1380
	tactgattt tattccaaac catccagggt gggtagctcc attagttaat catgctgggt	1440
	atgatggtac taaactttat gagaaattgc atccaaaagg tacaattgag aaattcttgc	1500
	caaaggataa gtttctgggt gtgttagatg gtgaagcgcc aaaattggaa gcagactatt	1560
10	tggttgacga tgatgaacaa gagcgactgg antatttggg caacttacct ctttgtcat	1620
	ctattcagaa tgtttatgat ttogaatact tggccaagaa gattttacct aaagatgcct	1680
	gggcatatta ttcttgtggt gccgatgatg aaatcacaat gagagaaaac cattatgctt	1740
	atcaaagagt ttatttcaga ccaagaattt gtgttgatgt caaggaagtt gatacttctt	1800
	atgaaatggt aggcactaaa acctctgttc ctttttatgt atctgccacc gctttggcta	1860
15	aattaggcca tctgatggt gaatgctcaa ttgctagagg cgctggtaag gaagggtcg	1920
	ttcaaagat ttcgaccctt tctcaatgt cattagatga aattgccgct gctagaattc	1980
	cagggtgaac ccaatgggtc caattatata ttaatgagga tagaaatgtc gctaaaggtc	2040
	tggtaaaca tgcagaagac ttgggtatga aggctatctt tataactgtt gatgctcctt	2100
	ctctaggtaa cagagaaaag gataaaagat taaagtttgt taatgacacc gatgtcgatt	2160
20	tgggtgattc cgcagatcga aacagtgggt cttcaaaggc actatcttcg ttcatgatg	2220
	cttctgtctc ttggaatgac gtcaaagcgg tcaagtcgtg gactaaattg cctgtcttag	2280
	ttaaagggtg tcaaacagtt gaagacgtta ttgaagctta cgatgctgggt tgtcaagggtg	2340
	ttgttttgtc aaaccacggt ggtaggcaac tagatactgc tctcctcca atcgaattat	2400
	tagctgaaac tgttccaact ttgaagagat tgggtaaatt aagaccagat tttgaaattt	2460
25	taattgacgg tgggtgtcaaa agaggtagcg atattttgaa agcagtcgca atcgggtggcc	2520
	aagatgtcag agtttcagtt ggtatgggta gacctttctt atatgccaac tcttgctatg	2580
	gtgaagcagg tgtagaaaa ttaattcaaa atctaaagga tgaattagaa atggatatga	2640
	gattgttggg tgtaactaaa atggaccagc tatcttcgaa acatgtcgat actaaacgtt	2700

	tgattggtag agatgcgatc aactatthtgt atgataatgt atacagccca atcgaaaccg	2760
	ttaaattcaa caatgaagat tgattgttgg aaatatatta ttcataaagg cgaaaacatt	2820
	cccttggtat tttattccaa atttatgata catagacgta ttttttatat ataaagtatt	2880
	attattaatg attcaagaaa aagttcaaatt aaactaatgg atcaacctat ttcgaccctt	2940
5	tcttcattgc tactttctcc ttaagcaaca gatgattaag tagatactgt ttttttagcc	3000
	aatagtatct cgccgaggag ttatacttga ctagctcttg ctcaagaatc ttcctaagac	3060
	gtactagcct agcatagtaa tctgtttgtt tctgtattgt ttgttctaac tgtttctacag	3120
	tcattgaatc aatatctcca atgtcttcga cgttgacaac tttccccccc ttggcagcat	3180
	tctctttttt gttggaatac gacattaaag attccttgat tttctgggta ccttcaatga	3240
10	ccattgaggg attaaatttg atttctttga tttataatg gtcggctatt agctcttcca	3300
	cttcgtcatc atgatcatca gatatgtcac gttgcctttt caatttatta aaattgttta	3360
	tcagtttatt gtgatcttgt atcaattcat tgcgtactct tttctcaata tcaaaagcta	3420
	ttttcttccc gctagactca aaatcaactc tgaagtcatt ttctcgctgg aattcatgta	3480
	tttcatggat taattctcta ttgatattct catatgcac ctgtaaactg ttgccgttga	3540
15	tattatgaac cgcttttaaa tgtttcaata aggcatctgc tctagtaaatt gccttcagac	3600
	attcaggtaa taaacagtaa aatggcttct cggctgtatg cgtcctaata tgagacaata	3660
	gcgcaaattct actgtgttgt ggagtaccat atcttggaca atttccccac ttacangaat	3720
	ggctctgtgtt gggttgttta aaatgattag tattcatgtg attaaccatc tcatccattt	3780
	ctctgaactg tgtcgagcag tcgtcccaac ggcaaatatg aatatctttg ggatccaatt	3840
20	ttgcctctnc ctccgaaata gtgtccttgt ctgattttag cctaaggcag tccatacttt	3900
	tgnactcttg ttcgagatcc tcatcggtta tccgcctagc aaacactata tcaattgtca	3960
	tcagttctga tggatgttc attcccaata agttgccgcc tttcctgtct aaacttcgtg	4020
	tttcgttact tctcctacta tccctcatga aaataaagta ctattcaca ttcattcccc	4080
	tgtttttgaa tttctgtgtt ttcttttcgc tcacaaaaat tctcaatttt tcaatttaatt	4140
25	agttttctcaa atattgaacg	4160

<210> 37

<211> 3840

<212> DNA

<213> Issatchenkia orientalis

<220>

<221> misc_feature

<222> (2042)..(2042)

5 <223> n é a, c, g, ou t

<220>

<221> misc_feature

<222> (2044)..(2044)

<223> n é a, c, g, ou t

10 <220>

<221> misc_feature

<222> (2970)..(2970)

<223> n é a, c, g, ou t

<220>

15 <221> misc_feature

<222> (3240)..(3240)

<223> n é a, c, g, ou t

<220>

<221> misc_feature

20 <222> (3654)..(3654)

<223> n é a, c, g, ou t

<400> 37

gcattaaaaa acattaacat togccacatt cgacacattc gctgcattcg ccacaacgtc 60

acgtgaggca togtagtttt gagttttttt tttttgataa atctcgtttc ctgtgatatg 120

25 tttgccgtgc gcttgggtcga ttttcacctt ctttgaaatc cgagttcggg aatgcaattg 180

ggaaaaagcc aaggagaaaag aaaacaaaaa gagagttgcg tagaaactcg gaatgctcga 240

agaaaccaga cagttgatgg ctggtttccg ttttgaggac gcttgggtgtg tgtaacttgg 300

atttgcacac tagagccgtc tctgcattgt attaaggtgt aaggacggtg aatcatcgcg 360

atggagcggg gttttttctt ttggcaggtt tttccgcgga aggcgagagg gcggaagggg 420
 ggggggtgta tgtagttcat atttcggcat tactacaagg atgtttccgt acattgcatg 480
 gtactgggggt tctccttttc ttgcacatct ccataaacta aatatcaata gatgtatccg 540
 tttggaatct catgactttt ggtgtgtggt ctgtgtcttc ccagttatct acttgagtga 600
 5 ttatgaacca gttttcacca ttggttacat accaaacaga gaacttatac gcaccagaac 660
 gccttttgtg tctttttgtt totcaagtat ttctatcagt ttccttcagt tatcccgga 720
 ctccattgtc ctcggtagt cctaccaatt taatgtttga ctctgcgtt ttctctgtc 780
 gcggacaaac ggtgcggctc ccccgatgat tcacgtaata agccggagtc aaccacagag 840
 gtcccctatg actcaacaag gcctcgtaga aactcggctt ctcgagaaa gagtcttttc 900
 10 tttttcactg gaaaatattt tttttttcct ttatattctt ttgaaccaa atgtggctac 960
 tataaaagtg cctttattcc ccagcttttc tagcatgatt gagtcacctt ccacaatgag 1020
 tcttctttgt tgtagtatt gtgaatatta tccgtgcagt tttcaagaac gttaatcaac 1080
 agcagtgata ataccttcaa aatgttaaga tcccagttca aaaacatttt gaaaaatgtt 1140
 aacaagaacc attctctaag gagaactttt acttccagca cctcaaaggc tggaaaaaat 1200
 15 gcttcataca atgccaagat tatactctga accgtggcct cgattgttgc agcagctggc 1260
 tcttatatgt tggccagcc ttactagct aatgatgagg cacagtctgc taatccaact 1320
 aggaagatct ctgttgacga atttgtaaa cacaaccatg ccgatgattg ttggatcact 1380
 gttaacggta acgtctatga cttgactgat ttcatttcaa tgcattccagg tggactacc 1440
 ccattgattc aaaatgcagg tcacgacgca actgaaattt acaacaagat tcatccaaag 1500
 20 ggtacaatcg agaacttctt accaaaggaa aagcaattgg gtgttttgga tggatgaagct 1560
 cctaaaatcg aagttgtgct tgacgaaaag gagaaacaca gattggagtt gttgaatcat 1620
 ctccctgtc tttccagaat tcaaaacatt tatgatttcg aacatattgc ttctagagtt 1680
 ttgagcgacc aagcatggaa ctactattca tgtggtgccg aagatgaaat caccttgagg 1740
 gaaaatcatt atgcttacca aagaatctac ttaagccaa aatgttgtgt caatgttgca 1800
 25 gaagttgata cctctcatga aattttaggt acaaaagctt ctgttccttt ctacgtttcc 1860
 gcagccgctt ctgcaaagtt ggggcacgag gatggtgaat gttccattgc tagaggtgca 1920
 ggtaaggaag gcgttattca aatgatttct tcttctctt ccaactcttt ggaggaaatt 1980
 gcagaatcca gaattcctgg tgcaacacaa tggtttcaat tatacgttaa tgaagacaag 2040

	gntnttgtga	agaagacttt	aaaaagggcc	gaaaacttgg	gtatgaaggc	catctttgtc	2100
	actgtggacg	ctgctagtag	aggtaataga	gaaaaagaca	ttacaatgag	aattaccgaa	2160
	gatacagatg	agttaataga	cgattcttct	gttagagctg	gttctacctc	tggtgcattg	2220
	ccagctttca	ttgacaagag	gctgacttgg	gatgaagtta	aggatatcat	ttcatggacc	2280
5	aagttaccag	ttttgctgaa	gggtgttcaa	agaactgatg	atattgagaa	ggcaattgat	2340
	attggttgta	aggggtgttg	cttgtccaat	catgggtgga	gacaattaga	tacttctcct	2400
	cctccaatag	aagttatggc	tgaatctgtt	ccaatcctaa	agcaaaaggg	taaactggat	2460
	ccaaatttca	gtattttcgt	tgatgggtgg	gttagaagag	gtacagatat	tttgaaagct	2520
	ttggctattg	gtggcagaga	ctgtaaagtt	gctgttggtc	tgggtagacc	tttcctttat	2580
10	gcaaatactg	gttatgggtga	aaagggtgtc	agaaaggccg	tgcaaattct	aagagaagaa	2640
	ttaaaggctg	acatgagaat	gttgggcgtt	acctctttga	acgagctaga	cgactcttac	2700
	attgacacca	gaagattact	aggtagagat	gctgttaacc	acataataca	caacaactac	2760
	taccaaatgt	ctaagattca	attcaaaaac	gaaaaataag	tctgatattt	gctaaattga	2820
	aatgaacctt	accatgccac	atctatagac	atcaaaacca	ttttcaattt	gtcgatatct	2880
15	tttgcataatc	aaagtaatac	caagcatgtt	caaaaagaaa	agaaagcata	actttaatac	2940
	tctatttcgaa	acactccgat	ccacaacacn	ttagtctttt	tagaccggtt	gttcatcttt	3000
	ctattacttt	attcctaact	gtatttttat	aattccgggt	ttataaaaga	ttaaactaat	3060
	atagcgcatt	ctttttgggt	acaaacatac	ataacggagc	tcattcatac	atcgcttttc	3120
	agttccgact	gggtgtttcg	atgcctcttt	ttctaaggag	ctagattctg	gccccacact	3180
20	agtctttgaa	ctcgttgctc	ccttaccacc	cttaccacca	gccttacttg	taggtttttt	3240
	agtagcatac	tctgcgtggt	tgactaaatt	cccttcctta	actttgtgcc	agcttggcca	3300
	tatcattaaa	taccactga	aacttctaac	aactcttcga	ccttcctgat	gggcctttga	3360
	aattgtatct	accaaacctg	ccttcaaggg	atgttcttta	tatcccctga	cgtctttcat	3420
	actttgaact	tcctctggga	cgtcttcctt	tccatatttt	tcccattggc	ccggcttggt	3480
25	tttagatttg	tctatctcac	ggaaaattga	ggggttcata	cttaatccac	tcacaccaac	3540
	cctgatgtta	gaagacagtt	ttgctaaatt	atttacattc	tgacttgtgt	ttgtcgatat	3600
	aactgaatca	gatggtttca	tcgatgattc	tcgggagact	ggttctgatg	gcgntcaccg	3660
	gggtctcaga	tgctgctgga	tttagcttta	atttgagccg	tttaaatagg	tcttcattta	3720

atgtttgttt tctttttttg tcgtagaaat gtgctgtgag atcaggaaat tggtcaagct 3780
 gttcacgact tagtttttagg gtgacatact tggttttttt aggtgccatt tctgtacaac 3840
 <210> 38
 <211> 33
 5 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Iniciador de amplificação para MEL5 gene
 <400> 38
 10 aaaaaagtcg accgataaca agctcatgca aag 33
 <210> 39
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 15 <220>
 <223> Iniciador de amplificação para gene MEL5
 <400> 39
 aaaaaaagat ctgcgtaacg aaataaatcc gc 32
 <210> 40
 20 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Iniciador de amplificação para flanco 3' CYB2
 25 <400> 40
 aaaaaacccg ggcttcctcc gctgcagggt ca 32
 <210> 41
 <211> 32

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador de amplificação para flanco 3' CYB2

5 <400> 41

aaaaaagagc tcgaagtctc tggatcctct tc

32

<210> 42

<211> 33

<212> DNA

10 <213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador de amplificação para flanco 5' CYB2.

<400> 42

aaaaaagacg tcctggctcg atacttctta ttc

33

15 <210> 43

<211> 32

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

20 <223> Iniciador de amplificação para flanco 5' CYB2

<400> 43

aaaaaaggcg ccgctggcag atactagttc ag

32

<210> 44

<211> 34

25 <212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador de amplificação para sequência K. thermotolerans

	<400> 44	
	tggactagtc actcgcaagc tgtgccatcg ccca	34
	<210> 45	
	<211> 37	
5	<212> DNA	
	<213> Sequência Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador de amplificação para sequência K. thermotolerans	
	<400> 45	
10	ggcccgcggc cgctagccgg catagaagac caccata	37
	<210> 46	
	<211> 39	
	<212> DNA	
	<213> Sequência Artificial	
15	<220>	
	<223> Iniciador de amplificação para sequência K. thermotolerans	
	<400> 46	
	actgacgcgt cgaccactcg caagctgtgc catcgccca	39
	<210> 47	
20	<211> 38	
	<212> DNA	
	<213> Sequência Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador de amplificação para sequência K. thermotolerans	
25	<400> 47	
	actgacgcgt cgactagccg gcatagaaga ccaccata	38
	<210> 48	
	<211> 42	

<212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Iniciador de amplificação para flanco 3' CYB2
 5 <400> 48
 cctcccccg g gatataaaa gttatattat taatgattca ag 42
 <210> 49
 <211> 43
 <212> DNA
 10 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Iniciador de amplificação para flanco 3' CYB2
 <400> 49
 ggacgagagc tcgggcccac gacttcagag ttgattttga gtc 43
 15 <210> 50
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 20 <223> gene URA3 iniciador de amplificação
 <400> 50
 aagmaracha ayttrtgtgc 20
 <210> 51
 <211> 19
 25 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Gene URA3 iniciador de amplificação

<400> 51
 aaharkcctc tccaacaat 19
 <210> 52
 <211> 2880
 5 <212> DNA
 <213> Issatchenkia orientalis
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2747)..(2747)
 10 <223> n é a, c, g, ou t
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2866)..(2866)
 <223> n é a, c, g, ou t
 15 <400> 52
 gaaggttaatt ccataagtgt gagtgtaccg cacaaccatc atggatatac aaaagatcaa 60
 actaatgata atgaaggcaa aaggaaactt gatgatggag atgtagaaga ggcacgtgac 120
 agcaaaatct tgaagaagcc aaaaacagag gaaacttcaa tcgtcgaaga agataagcca 180
 caaattaggt tgaggaccag aagtatggtt aataatgaaa acacagtcaa aaaatttcag 240
 20 caattatccc tacctatact aacaaatatt tcgtcgcacg gtatcgcttc aatgtttttg 300
 acgccagtca atgctatgga agagcctgat ttttttaaag taattaagaa accaattgac 360
 ttgaagacta taataaaaaa ggtcaggaac ttttctataa acaccctcga agagcttgaa 420
 tttgaaatgc aactgatgtt cacgaatgcg ataatgtaca atacaagtga taaagttgaa 480
 ggaatatcgg atatgatgaa agaatggcaa gatctagtag taatattgaa agaaaatatg 540
 25 taataggtat agtccgtcag ttatattgga agataataag aaaagaatat caaaactatt 600
 taattagtta attgtataaa ctgtatgtca ttataaacag ggaaggttga cattgtctag 660
 cggcaatcat tgtctcattt ggttcattaa cttttgggtc tgttcttgga aacgggtacc 720
 aactctctca gagtgcctca aaaatttttc agcacatttg gttagacatg aactttctct 780

	gctgggtaag gattcagagg tgaagtcttg aacacaatcg ttgaaacatc tgtccacaag	840
	agatgtgtat agcctcatga aatcagccat ttgcttttgt tcaacgatct tttgaaattg	900
	ttgttgttct tggtagttaa gttgatccat cttggcttat gttgtgtgta tgtttagatt	960
	attcttagta tattcctgtc ctgagtttag tgaaacataa tatcgcttg aaatgaaaat	1020
5	gctgaaattc gtcgacatac aatttttcaa actttttttt tttcttgggtg cacggacatg	1080
	tttttaaagg aagtactcta taccagttat tcttcacaaa tttaattgct ggagaataga	1140
	tcttcaacgc tttaataaag tagtttgttt gtcaaggatg gcgtcataca aagaaagatc	1200
	agaatcacac acttccccctg ttgctaggag acttttctcc atcatggagg aaaagaagtc	1260
	taacctttgt gcatcattgg atattactga aactgaaaag cttctctcta ttttgacac	1320
10	tattggctct tacatctgtc tagttaaaac acacatcgat attgtttctg attttacgta	1380
	tgaaggaact gtgttgctt tgaaggagct tgccaagaaa cataatttta tgatttttga	1440
	agatagaaaa tttgctgata ttggtaacac tgttaaaaat caatataaat ctggtgtctt	1500
	ccgtattgcc gaatgggctg acatcactaa tgcacatggt gtaacgggtg caggtattgt	1560
	ttctggcttg aaggaggccg cccaagaaac aaccagtga cctagagggt tgctaattgt	1620
15	tgctgagtta tcatcaaagg gttcttttagc atatggtgaa tatacagaaa aaacagtaga	1680
	aattgctaaa tctgataaag agtttgtcat tggttttatt gcgcaacacg atatgggctg	1740
	tagagaagaa ggttttgact ggatcattat gactccaggg gttggtttag atgacaaagg	1800
	tgatgcactt ggtcaacaat atagaactgt tgatgaagtt gtaaagactg gaacggatat	1860
	cataattgtt ggtagagggt tgtatggtca aggaagagat cctgtagagc aagctaaaag	1920
20	ataccaacaa gctggttgga atgcttattt aaacagattt aaatgattct tacacaaaga	1980
	tttgatacat gtacactagt ttaaataagc atgaaaagaa ttacacaagc aaaaaaaaaat	2040
	taaatgaggt actttacgtt cacctacaac caaaaaaact agatagagta aaatcttatg	2100
	atttagaaaa agttgtttta caaaggcttt agtatgtgaa tttttaatgt agcaaagcga	2160
	taactaataa acataaacia aagtatgggt ttctttatca gtcaaatcat tatcgattga	2220
25	ttgttccgcg tattctaagt gttttatata attcatagtt aacgattgct tttgtttatt	2280
	ctgtattctc agcataagat agtaaaggat accggtgaac gccataattg aaaaggaagc	2340
	ttccatggca tgtatcccca tcggatactt tgggtgcttga gaacctttga aaaaatatgg	2400
	accgataatg ttaccaactg cataccaaac tgcaacagaa acatacatga acgtcttctt	2460

ggtagatcct gaggtgtttg aagataccaa cgccaacatt aatgtccatg gcacattgta 2520
 gaatcccac c aaataaattc cagctaattgc agcatgtcga ttttcgtgtg gatcaatctt 2580
 atttaccata atagccccag ctaaagcagg tagacacggt aatacccaca ataaacacct 2640
 aatattatga atccacatgc agattgctgt tatcagcata ccacctccca aggcaactgc 2700
 5 tgcctgagga gacgccataa gtgttggttt gagagcagaa aaccanaac ctttgattat 2760
 aagaggattg aaatttggtta gtccgaatt acagatggac tgacatataa taaatgcaac 2820
 aacaatataa tatttgggat ccaacaaagc ctcccagatt tgatanattt tcaatttggtg 2880
 <210> 53
 <211> 262
 10 <212> PRT
 <213> Issatchenkia orientalis
 <400> 53
 Met Ala Ser Tyr Lys Glu Arg Ser Glu Ser His Thr Ser Pro Val Ala
 1 5 10 15
 15 Arg Arg Leu Phe Ser Ile Met Glu Glu Lys Lys Ser Asn Leu Cys Ala
 20 25 30
 Ser Leu Asp Ile Thr Glu Thr Glu Lys Leu Leu Ser Ile Leu Asp Thr
 35 40 45
 Ile Gly Pro Tyr Ile Cys Leu Val Lys Thr His Ile Asp Ile Val Ser
 20 50 55 60
 Asp Phe Thr Tyr Glu Gly Thr Val Leu Pro Leu Lys Glu Leu Ala Lys
 65 70 75 80
 Lys His Asn Phe Met Ile Phe Glu Asp Arg Lys Phe Ala Asp Ile Gly
 85 90 95
 25 Asn Thr Val Lys Asn Gin Tyr Lys Ser Gly Val Phe Arg Ile Ala Glu
 100 105 110
 Trp Ala Asp Ile Thr Asn Ala His Gly Val Thr Gly Ala Gly Ile Val
 115 120 125

Ser Gly Leu Lys Glu Ala Ala Gln Glu Thr Thr Ser Glu Pro Arg Gly
 130 135 140
 Leu Leu Met Leu Ala Glu Leu Ser Ser Lys Gly Ser Leu Ala Tyr Gly
 145 150 155 160
 5 Glu Tyr Thr Glu Lys Thr Val Glu Ile Ala Lys Ser Asp Lys Glu Phe
 165 170 175
 Val Ile Gly Phe Ile Ala Gln His Asp Met Gly Gly Arg Glu Glu Gly
 180 185 190
 Phe Asp Trp Ile Ile Met Thr Pro Gly Val Gly Leu Asp Asp Lys Gly
 10 195 200 205
 Asp Ala Leu Gly Gln Gln Tyr Arg Thr Val Asp Glu Val Val Lys Thr
 210 215 220
 Gly Thr Asp Ile Ile Ile Val Gly Arg Gly Leu Tyr Gly Gln Gly Arg
 225 230 235 240
 15 Asp Pro val Glu Gln Ala Lys Arg Tyr Gln Gln Ala Gly Trp Asn Ala
 245 250 255
 Tyr Leu Asn Arg Phe Lys
 260

<210> 54

20 <211> 34

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Amplifciation iniciador para URA3 flanco 3'

25 <400> 54

ctccccggg caacaaagcc tccagattt gata

34

<210> 55

<211> 34

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador de amplificação para flanco 3' URA3

5 <400> 55

ggacgggccc cctaggtatt gcggctgttt atac

34

<210> 56

<211> 43

<212> DNA

10 <213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador de amplificação para URA3 flanco 5'

<400> 56

ggacatgcat gcgagctctc aaaactatatt aattagttaa ttg

43

15 <210> 57

<211> 52

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

20 <223> Iniciador de amplificação para flanco 5' URA3

<400> 57

ggacatgcat gctacgtacc ctgcaggggtg aagaataact ggtatagagt ac

52

<210> 58

<211> 28

25 <212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> iniciador de teste URA 3

	<400> 58	
	gatatgatga aagaatggca agatctag	28
	<210> 59	
	<211> 26	
5	<212> DNA	
	<213> Sequência Artificial	
	<220>	
	<223> iniciador de teste URA 3	
	<400> 59	
10	sattgctcgt taccactgaa aagagg	26
	<210> 60	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Sequência Artificial	
15	<220>	
	<223> iniciador degenerativo	
	<400> 60	
	ggkgctaach tbgcymcmga r	21
	<210> 61	
20	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Sequência Artificial	
	<220>	
	<223> iniciador degenerativo	
25	<400> 61	
	dgtratbara tcrgevacac c	21
	<210> 62	
	<211> 21	

	<212> DNA	
	<213> Sequência Artificial	
	<220>	
	<223> Oligo degenerativo	
5	<400> 62	
	krtygghycy ggtaactggg g	21
	<210> 63	
	<211> 21	
	<212> DNA	
10	<213> Sequência Artificial	
	<220>	
	<223> oligo degenerativo	
	<400> 63	
	rtgraagtad ggtckgtgga a	21
15	<210> 64	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> Sequência Artificial	
	<220>	
20	<223> iniciador de avanço PCR	
	<400> 64	
	ccattgccgg tgcactcaag aatgtcg	27
	<210> 65	
	<211> 27	
25	<212> DNA	
	<213> Sequência Artificial	
	<220>	
	<223> iniciador reverso PCR	

	<400> 65	
	cgacattctt gagtgcaccg gcaatgg	27
	<210> 66	
	<211> 27	
5	<212> DNA	
	<213> Sequência Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador PCR Nested	
	<400> 66	
10	ggctgctgga tttgtcgaag gtttagg	27
	<210> 67	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> Sequência Artificial	
15	<220>	
	<223> Iniciador PCR Nested	
	<400> 67	
	ccttgccctt acctctgaaa tcgtccg	27
	<210> 68	
20	<211> 42	
	<212> DNA	
	<213> Sequência Artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador PCR flanco 3' CYB2	
25	<400> 68	
	cctcccccg g gatatcaaa gttatattat taatgattca ag	42
	<210> 69	
	<211> 43	

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador PCR flanco 3' CYB2

5 <400> 69

ggacgagagc tcggggcccat gacttcagag ttgattttga gtc

43

<210> 70

<211> 44

<212> DNA

10 <213> Sequência Artificial

<220>

<223> iniciador flanco 5' CYB2

<400> 70

ggacatgcat gcgagctcaa tgcgtgacac cgccatgatg gttg

44

15 <210> 71

<211> 52

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

20 <223> iniciador flanco 5' CYB2

<400> 71

ggacatgcat gctacgtacc ctgcagggca ccaacagcaa cacccacctg as

52

<210> 72

<211> 43

25 <212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> iniciador flanco 5' CYB2

	<400> 72	
	ggacatgcat gcgagctcat agttgaacaa acaactggcat ttg	43
	<210> 73	
	<211> 52	
5	<212> DNA	
	<213> Sequência Artificial	
	<220>	
	<223> iniciador flanco 5' CYB2	
	<400> 73	
10	ggacatgcat gctacgtacc ctgcaggtgt gtgcaactag gtttatgtgg ag	52
	<210> 74	
	<211> 53	
	<212> DNA	
	<213> Sequência Artificial	
15	<220>	
	<223> iniciador flanco 3' CYB2	
	<400> 74	
	cctcccccg g gatatctag ttagatagct cctcctccaa tcgaattatt agc	53
	<210> 75	
20	<211> 42	
	<212> DNA	
	<213> Sequência Artificial	
	<220>	
	<223> iniciador flanco 3' CYB2	
25	<400> 75	
	ggacgagagc tcggggcccta cgtctatgta tcataaattt gg	42
	<210> 76	
	<211> 33	

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> gene GPD1 iniciador

5 <400> 76

aaaaaacata tggagatggt aatatgtggg tct

33

<210> 77

<211> 33

<212> DNA

10 <213> Sequência Artificial

<220>

<223> GPD1 iniciador

<400> 77

ttttttcctg caggtcagta ataacagtgg aga

33

15 <210> 78

<211> 30

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

20 <223> gene GPD1 iniciador

<400> 78

aaaaaacccg ggggtgcctta tcaggtgcta

30

<210> 79

<211> 30

25 <212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> GPD1 iniciador

	<400> 79	
	ttttttgaat tcaaggttgc agcatgacag	30
	<210> 80	
	<211> 20	
5	<212> DNA	
	<213> Sequência Artificial	
	<220>	
	<223> GPD1 iniciador	
	<400> 80	
10	gagttcaccc gtccagatag	20
	<210> 81	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> Sequência Artificial	
15	<220>	
	<223> GPD1 iniciador	
	<400> 81	
	ggacaacgta catggacgat tc	22
	<210> 82	
20	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Sequência Artificial	
	<220>	
	<223> GPD1 iniciador	
25	<400> 82	
	ctatctggac ggggtgaactc	20
	<210> 83	
	<211> 18	

<212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> GPD1 iniciador
 5 <400> 83 ggactggggg tgtacaat 18
 <210> 84
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 10 <220>
 <223> GPD1 iniciador
 <400> 84
 cttgtgcagg ctcagacttg 20
 <210> 85
 15 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> GPD1 iniciador
 20 <400> 85
 caaggcattc tggcagcttc 20
 <210> 86
 <211> 22
 <212> DNA
 25 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Iniciador
 <400> 86

cggttcctcaa agcggactta cc 22

<210> 87

<211> 22

<212> DNA

5 <213> Sequência Artificial

<220>

<223> GPD1 iniciador

<400> 87

aaggccgaca gccattcaa gg 22

10 <210> 88

<211> 44

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

15 <223> PDC1 iniciador

<400> 88

ccggaattcg atatctgggc wggkaatgcc aaygarttra atgc 44

<210> 89

<211> 44

20 <212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> PDC1 iniciador

<220>

25 <221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> n é a, c, g, ou t

<220>

<221> misc_feature
 <222> (33)..(33)
 <223> n é a, c, g, ou t
 <400> 89
 5 cgcggtattca ggctcagta ngaraawgaa ccngtrtttra artc 44
 <210> 90
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 10 <220>
 <223> iniciador de sequência PDC1
 <400> 90
 atggcaagag aggaaaaacc tcgtaaag 28
 <210> 91
 15 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <400> 91
 20 ccacgaagag tcattgaaga accttaa 27
 <210> 92
 <211> 714
 <212> DNA
 <213> Pichia membranifaciens
 25 <400> 92
 gggatatgaag ctgatggata ctccagagtc aacggctttg catgcctggt taccaccttc 60
 ggtgtcggcg aattgtctgc tgtcaacgcc gttgcagggtg cgtatgcaga gcacattcca 120
 ttaatccacg tggtcggtat gccttccatc tccgccgaga agcaaaagct tctacttcac 180

cacacgtag gtgattcgag gttcgatgat tttaccgcaa tgtcccagaa gatcagcatc 240
 aagctcaagg ttatcactga gtttgacgat gcaccaaagg ttataaacga cttgattgaa 300
 acagccatac tcaccaagag accggtttat ctcggtttcc caagtaactt ttcagaggca 360
 ttgataccag cctccgattt gacaaagtac aagcttaagt tgtctttgcc tccaaacaat 420
 5 gaagagtctg aaaatgagtt tgtggaaaac gttattcagc tgatggagaa ggctaagaac 480
 cctgtgattt tggttgatgc ctgtgcttcc cgtcatgctg tcattgaaca agttgaagaa 540
 gttgctagac ttacaaagtt cccagttttt accactcaa tgggtaaagg ctctttcaac 600
 gaagacaata gogaatatta cggatatgtac attggtgctt tatctgctcc tgatgttaag 660
 gagatcgtag agtccacaga ctgtatcatc tctatcgggtg gggtattatc agat 714
 10 <210> 93
 <211> 957
 <212> DNA
 <213> *Bacillus megaterium*
 <400> 93
 15 atgaaaacac aatttacacc aaaaacacga aaagttgccg ttatcggaac tggttttggt 60
 ggctcaagct acgctttttc aatggtgaat caaggtattg ccaatgaatt agtggttaatc 120
 gatatgaaca aagaaaaagc agaagggtgaa gcacgtgata tcaatcatgg aatgccattt 180
 gccacaccga tgaaaatctg ggctggagat tataaagact gtgctgacgc tgatttagca 240
 gttattacag cgggcgctaa tcaagctcca ggggaaacac gcttagatct agttgaaaaa 300
 20 aacgttaaaa ttttcgaatg cattgtaaaa gatattatga acagcggatt tgacggcatc 360
 attttagtggt caacaaatcc agttgatatt ctgcacacg ttacacaaaa agtatcagga 420
 ttaccaaacg gacgggtaat tggttcagga acgattcttg acacagctcg cttccgctac 480
 ttgttaagcg actatttoga agtagattct cgcaacgtcc acgcttatat tatgggggaa 540
 catggagata cgggaatttcc tgtttgagc cagcgcaaaa ttggcggtgt gaagctcgaa 600
 25 cattttatca atactgccgc tattgaaaaa gaaccggata tgcagcatct attcgaacaa 660
 accgcgatg cggcttacca tattattaat cgaaaaggag cgacttatta cggaattgca 720
 atggggcttg tacgcattac caaggctatt ttagatgatg aaaattctat tttaacagta 780
 tctgctttat tagaaggaca atacggtatt tctgatgtgt atatcggcgt accagctatc 840

attaataaaaa acggcgtgcg tcaaattatt gaattgaatt taactcctca cgaacagcag 900
 cagctcgagc actctgctag cattcttaag caaactcgcg acagagcttt tgtgtaa 957

<210> 94

<211> 972

5 <212> DNA

<213> *Lactobacillus helveticus*

<400> 94

atggcaagag aggaaaaacc tcgtaaagtt attttagtcg gtgatggtgc tgtaggttct 60
 acctttgcat tttcaatggt acaacaagggt atcgctgaag aattaggtat tatcgatata 120
 10 gctaaggaac acgttgaagg tgacgcaatc gatttagctg acgcaactcc ttggacttct 180
 ccaaagaaca tttacgcagc tgactacca gattgtaagg atgctgactt agttgttatt 240
 actgctggtg ctccacaaaa gccaggcgaa actcgtcttg atcttggtta caagaacttg 300
 aagattttat catcaatcgt tgaaccagtt gttgaatcag gttttgaagg tattttctta 360
 gtagttgcta acccagttga tatcttaact cacgcaactt ggagaatgtc aggcttcct 420
 15 aaggatcgtg ttatcggttc aggtacttca cttgatactg gtcgtcttca aaaagttatt 480
 ggtaaaatgg aaaacgttga cccaagttca gttaatgcat acatgcttgg tgaacacggt 540
 gatactgaat tcccagcatg gagctacaac aatggtgctg gcgtaaagggt tgctgactgg 600
 gttaaggctc acaacatgcc tgaatctaag cttgaagaca tccaccaaga agttaaggac 660
 atggcttacg acattattaa caagaaagggt gctaccttct acggtatcgg tactgcttca 720
 20 gcaatgatcg ctaaggctat cttgaacgat gaacaccgtg tacttccact ttcagtacca 780
 atggatggtg aatatggttt acacgatctt cacatcggtc ctctgcagt tggtggccgc 840
 aagggtcttg aacaagttat cgaaatgcc ttaagcgata aggaacaaga attaagact 900
 gcttcagcag atcaattaa gaaggttatg gacaaggcct tcaaagaaac tggcgttaag 960
 gttcgtcaat as 972

25 <210> 95

<211> 318

<212> PRT

<213> *Bacillus megaterium*

<400> 95

Met Lys Thr Gin Phe Thr Pro Lys Thr Arg Lys Val Ala Val Ile Gly

1 5 10 15

Thr Gly Phe Val Gly Ser Ser Tyr Ala Phe Ser Met Val Asn Gln Gly

5 20 25 30

Ile Ala Asn Glu Leu Val Leu Ile Asp Met Asn Lys Glu Lys Ala Glu

35 40 45

Gly Glu Ala Arg Asp Ile Asn His Gly Met Pro Phe Ala Thr Pro Met

50 55 60

10 Lys Ile Trp Ala Gly Asp Tyr Lys Asp Cys Ala Asp Ala Asp Leu Ala

65 70 75 80

Val Ile Thr Ala Gly Ala Asn Gln Ala Pro Gly Glu Thr Arg Leu Asp

85 90 95

Leu Val Glu Lys Asn Val Lys Ile Phe Glu Cys Ile Val Lys Asp Ile

15 100 105 110

Met Asn Ser Gly Phe Asp Gly Ile Ile Leu Val Ala Thr Asn Pro Val

115 120 125

Asp Ile Leu Ala His Val Thr Gln Lys Val Ser Gly Leu Pro Asn Gly

130 135 140

20 Arg Val Ile Gly Ser Gly Thr Ile Leu Asp Thr Ala Arg Phe Arg Tyr

145 150 155 160

Leu Leu Ser Asp Tyr Phe Glu Val Asp Ser Arg Asn Val His Ala Tyr

165 170 175

Ile Met Gly Glu His Gly Asp Thr Glu Phe Pro Val Trp Ser His Ala

25 180 185 190

Gln Ile Gly Gly Val Lys Leu Glu His Phe Ile Asn Thr Ala Ala Ile

195 200 205

Glu Lys Glu Pro Asp Met Gln His Leu Phe Glu Gln Thr Arg Asp Ala

210 215 220
 Ala Tyr His Ile Ile Asn Arg Lys Gly Ala Thr Tyr Tyr Gly Ile Ala
 225 230 235 240
 Met Gly Leu Val Arg Ile Thr Lys Ala Ile Leu Asp Asp Glu Asn Ser
 5 245 250 255
 Ile Leu Thr Val Ser Ala Leu Leu Glu Gly Gin Tyr Gly Ile Ser Asp
 260 265 270
 Val Tyr Ile Gly Val Pro Ala Ile Ile Asn Lys Asn Gly Val Arg Gln
 275 280 285
 10 Ile Ile Glu Leu Asn Leu Thr Pro His Glu Gin Gin Gin Leu Glu His
 290 295 300
 Ser Ala Ser Ile Leu Lys Gin Thr Arg Asp Arg Ala Phe Val
 305 310 315
 <210> 96
 15 <211> 323
 <212> PRT
 <213> Lactobacillus helveticus
 <400> 96
 Met Ala Arg Glu Glu Lys Pro Arg Lys Val Ile Leu Val Gly Asp Gly
 20 1 5 10 15
 Ala Val Gly ser Thr Phe Ala Phe ser Met Val Gin Gin Gly Ile Ala
 20 25 30
 Glu Glu Leu Gly Ile Ile Asp Ile Ala Lys Glu His Val Glu Gly Asp
 35 40 45
 25 Ala Ile Asp Leu Ala Asp Ala Thr Pro Trp Thr Ser Pro Lys Asn Ile
 50 55 60
 Tyr Ala Ala Asp Tyr Pro Asp Cys Lys Asp Ala Asp Leu Val Val Ile
 65 70 75 80

Thr Ala Gly Ala Pro Gln Lys Pro Gly Glu Thr Arg Leu Asp Leu Val

85

90

95

Asn Lys Asn Leu Lys Ile Leu Ser Ser Ile Val Glu Pro Val Val Glu

100

105

110

5 Ser Gly Phe Glu Gly Ile Phe Leu Val Val Ala Asn Pro Val Asp Ile

115

120

125

Leu Thr His Ala Thr, Trp Arg Met Ser Gly Phe Pro Lys Asp Arg val

130

135

140

Ile Gly ser Gly Thr Ser Leu Asp Thr Gly Arg Leu Gln Lys Val Ile

10 145

150

155

160

Gly Lys Met Glu Asn Val Asp Pro Ser Ser Val Asn Ala Tyr Met Leu

165

170

175

Gly Glu His Gly Asp Thr Glu Phe Pro Ala Trp Ser Tyr Asn Asn Val

180

185

190

15 Ala Gly Val Lys Val Ala Asp Trp Val Lys Ala His Asn Met Pro Glu

195

200

205

Ser Lys Leu Glu Asp Ile His Gln Glu Val Lys Asp Met Ala Tyr Asp

210

215

220

Ile Ile Asn Lys Lys Gly Ala Thr Phe Tyr Gly Ile Gly Thr Ala Ser

20 225

230

235

240

Ala Met Ile Ala Lys Ala Ile Leu Asn Asp Glu His Arg Val Leu Pro

245

250

255

Leu Ser Val Pro Met Asp Gly Glu Tyr Gly Leu His Asp Leu His Ile

260

265

270

25 Gly Thr Pro Ala val val Gly Arg Lys Gly Leu Glu Gln Val Ile Glu

275

280

285

Met Pro Leu Ser Asp Lys Glu Gln Glu Leu Met Thr Ala Ser Ala Asp

290

295

300

Gln Leu Lys Lys Val Met Asp Lys Ala Phe Lys Glu Thr Gly Val Lys

305

310

315

320

Val Arg Gln

<210> 97

5 <211> 1728

<212> DNA

<213> *Issatchenkia orientalis*

<400> 97

	atgactgaca aaatctocct aggtacttat ctgtttgaaa agttaaagga agcaggctct	60
10	tattccatct ttggtgttcc tggtgatttc aatttggcat tgttggacca cgtcaaggaa	120
	gttgaaggca ttagatgggt cggtaacgct aacgagttga atgccggcta cgaagctgat	180
	ggttatgcaa gaatcaatgg atttgcatcc ctaatcacca ctttgggtgt cggatgaattg	240
	tctgccgtca atgccattgc aggttcttat gctgaacacg tcccattgat ccatattggt	300
	ggtatgcctt ccttgtctgc tatgaagaac aacttggtgt tacaccatac cttgggtgac	360
15	acaagattcg acaacttcac cgaaatgtca aagaaaatca gtgcaaagggt tgaaattggt	420
	tacgatttgg aatcagctcc aaaattaatt aataacttga ttgaaaccgc ttatcacaca	480
	aagagaccag tctacttggg acttccttcc aactttgctg atgaattggt tccagcggca	540
	ttagttaagg aaaacaagtt acatttagaa gaacctctaa acaaccccggt tgctgaagaa	600
	gaattcattc ataacgttgt tgaaatgggc aagaaggcag aaaaaccaat cattctcggt	660
20	gacgcttggt ctgcaagaca taacatttct aaggaagtga gagagttggc taaattgact	720
	aaattccctg tcttcaccac cccaatgggt aaatctactg ttgatgaaga tgatgaagaa	780
	ttctttggct tatacttggg ttctctatct gctccagatg ttaaggacat tgttggccca	840
	accgattgta tcttatcctt aggtggttta ccttctgatt tcaacaccgg ttccttctca	900
	tatggttaca ccactaagaa tgtcgttgaa ttccattcca actactgtaa attcaaactct	960
25	gcaacttatg aaaacttgat gatgaagggc gcagtccaaa gattgatcag cgaattgaag	1020
	aatattaagt attccaatgt ctcaacttta tctccaccaa aatctaaatt tgcttacgaa	1080
	tctgcaaagg ttgctocaga aggtatcatc actcaagatt acctgtggaa gagattatct	1140
	tacttcttaa agccaagaga tatcattgtc actgaaactg gtacttcctc ctttgggtgc	1200

ttggctaccc acttaccaag agattcaaag tctatctccc aagtcttatg gggttccatt 1260
 ggttttctcct taccagctgc agttgggtgct gcatttgctg ctgaagatgc acacaaacaa 1320
 actggcgaac aagaaagaag aactgttttg tttattgggtg atggttcttt acaattgact 1380
 gtccaatcaa tctcagatgc tgcaagatgg aacatcaagc catacatctt catcttaaac 1440
 5 aacagagggtt acactatcga aaagttgatc cacggtcgtc atgaggacta caaccaaatt 1500
 caaccatggg atcaccaatt gttattgaag ctctttgctg acaagacca atatgaaaac 1560
 catgttggtta aatccgctaa ggacttggac gctttgatga aggatgaagc attcaacaag 1620
 gaagataaga ttagagtcac tgaattattc ttggatgaat tcgatgctcc agaaatcttg 1680
 gttgctcaag ctaaattatc tgatgaaatc aactctaaag ccgcttaa 1728

REIVINDICAÇÕES

1. Célula de levedura geneticamente modificada de uma espécie dentro do clado *I. orientalis*/*P. fermentans*, **CARACTERIZADA** pelo fato de que tem pelo menos um gene de lactato desidrogenase (LDH) exógeno.

2. Célula de levedura, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que é da espécie *Issatchenkia orientalis*, *Pichia galeiformis*, *Pichia* sp. YB-4149 (designação NRRL), *Candida ethanolica*, *P. deserticola*, *P. membranifaciens* ou *P. fermentans*.

3. Célula de levedura, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o gene LDH exógeno está integrado no genoma da célula de levedura.

4. Célula de levedura, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o gene LDH exógeno é um gene LDH funcional que é pelo menos 35% idêntico a um gene L-LDH funcional de qualquer uma das espécies *Lactobacillus helveticus*, *L. casei*, *Bacillus megaterium*, *Pediococcus acidilactici*, *Bos taurus* ou *Rhizopus oryzae*.

5. Célula de levedura, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o gene LDH exógeno é um gene LDH funcional que codifica uma proteína pelo menos 80% idêntica àquela codificada por um gene L-LDH funcional de qualquer uma das espécies *Lactobacillus helveticus*, *L. casei*, *Bacillus megaterium*, *Pediococcus acidilactici*, *Bos taurus* ou *Rhizopus oryzae*.

6. Célula de levedura, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o gene LDH exógeno

funcional codifica uma proteína que é, pelo menos, 60% idêntica a pelo menos uma dentre SEQ. ID. NO. 93, SEQ. ID. NO. 94, SEQ. ID. NO. 95 ou SEQ. ID. NO. 96.

7. Célula de levedura, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o gene LDH exógeno é um gene D-LDH funcional que é pelo menos 45% idêntico a um gene D-LDH funcional de qualquer uma das espécies *L. helveticus*, *L. johnsonii*, *L. bulgaricus*, *L. delbrueckii*, *P. acidilactici*, *L. plantarum* e *L. pentosus*.

8. Célula de levedura, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o gene LDH exógeno é um gene LDH funcional que codifica uma proteína pelo menos 45% idêntica àquela codificada por um gene D-LDH funcional de qualquer uma das espécies *L. helveticus*, *L. johnsonii*, *L. bulgaricus*, *L. delbrueckii*, *P. addilactici*, *L. plantarum* e *L. pentosus*.

9. Célula de levedura, de acordo com quaisquer reivindicações 1 a 8, **CARACTERIZADA** pelo fato de que tem uma deleção ou ruptura de um gene piruvato descarboxilase (PDC) nativo.

10. Célula de levedura, de acordo com a reivindicação 9, **CARACTERIZADA** pelo fato de que é incapaz de produzir etanol.

11. Célula de levedura, de acordo com quaisquer reivindicações 1 a 8, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o gene LDH exógeno está sob o controle transcricional de um promotor que é nativo para uma célula de levedura.

12. Célula de levedura, de acordo com a reivindicação

cação 11, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o promotor é nativo à célula hospedeira.

13. Célula de levedura, de acordo com quaisquer reivindicações 1 a 8, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o gene LDH é integrado em um local de um gene PDC nativo.

14. Célula de levedura, de acordo com quaisquer reivindicações 1 a 8, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a célula hospedeira é *I. orientalis* ou *P. membranifaciens*.

15. Célula de levedura, de acordo com a reivindicação 9, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a célula hospedeira é *I. orientalis* ou *P. membranifaciens*.

16. Célula de levedura, de acordo com a reivindicação 10, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a célula hospedeira é *I. orientalis* ou *P. membranifaciens*.

17. Célula de levedura, de acordo com quaisquer reivindicações 1 a 8, **CARACTERIZADA** pelo fato de que adicionalmente tem pelo menos uma outra modificação genética selecionada a partir de (1) uma inserção de um gene xilose isomerase funcional exógeno, (2) uma deleção ou ruptura de um gene nativo que produza uma enzima que catalise a conversão de xilose para xilitol, (3) uma deleção ou ruptura de um gene xilitol desidrogenase funcional e/ou (4) uma modificação que faça com que a célula super-expresse uma xiluloquinase funcional.

18. Célula de levedura de uma espécie do clado *Is-satchenkia orientalis*/*P. Fermentans*, **CARACTERIZADA** pelo fato de que tem pelo menos mais uma modificação genética selecionada a partir de (1) uma inserção de um gene xilose isomera-

se funcional exógeno, (2) uma deleção ou ruptura de um gene nativo que produza uma enzima que catalise a conversão de xilose para xilitol, (3) uma deleção ou ruptura de um gene xilitol desidrogenase funcional e/ou (4) uma modificação que
5 faça com que a célula super-exprese uma xiluloquinase funcional.

19. Célula de levedura, de acordo com a reivindicação 18, **CARACTERIZADA** pelo fato de que é da espécie *Issatchenkia orientalis*, *Pichia galeiformis*, *Pichia sp. YB-4149*
10 (designação NRRL), *Candida ethanolica*, *P. deserticola*, *P. membranifaciens* ou *P. fermentans*.

20. Processo de fermentação, **CARACTERIZADO** pelo fato de que uma célula de levedura geneticamente modificada, conforme definida na reivindicação 1, é cultivada sob condições de fermentação em um caldo de fermentação que inclui um
15 açúcar fermentável para a produção de ácido lático ou de um sal do mesmo.

21. Processo de fermentação, de acordo com a reivindicação 20, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o açúcar fermentável inclui glicose.
20

22. Processo, de acordo com a reivindicação 20 ou 21, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o pH do caldo de fermentação durante pelo menos uma parte do período de fermentação está na faixa de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 4,5.

23. Processo, de acordo com a reivindicação 22, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o pH do caldo de fermentação durante pelo menos uma parte do período de fermentação está no intervalo de aproximadamente 1,9 a aproximadamente 3,5.
25

24. Processo, de acordo com a reivindicação 23, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o pH do caldo de fermentação está dentro do intervalo de aproximadamente 1,9 a aproximadamente 3,5 durante todo o período de fermentação.

5 25. Processo, de acordo com a reivindicação 23, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o pH do caldo de fermentação no início da fermentação é de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 6, e o pH cai durante a fermentação para aproximadamente 1,9 a aproximadamente 3,5.

10 26. Processo, de acordo com a reivindicação 20 ou 21, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é uma fermentação anaeróbia ou microaeróbia.

27. Processo, de acordo com a reivindicação 20 ou 21, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é uma fermentação quase
15 anaeróbia ou anaeróbia.

28. Processo, de acordo com a reivindicação 20 ou 21, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o rendimento de lactato em glicose é 0,55 - 0,95 g/g

29. Processo, de acordo com a reivindicação 20,
20 **CARACTERIZADO** pelo fato de que adicionalmente compreende a recuperação do lactato do caldo de fermentação.

30. Processo, de acordo com a reivindicação 29, **CARACTERIZADO** pelo fato de que adicionalmente compreende a produção de lactídeo do lactato recuperado.

25 31. Processo, de acordo com a reivindicação 30, **CARACTERIZADO** pelo fato de que adicionalmente compreende a polimerização do lactídeo para formar um poli(lactídeo)polímero.

32. Vetor de transformação de levedura, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende um gene lactato desidrogenase funcional operativamente ligado a uma sequência promotora que é nativa a uma espécie do clado *I. orientalis*/*P. fermentans*.

33. Vetor de transformação de levedura, de acordo com a reivindicação 32, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a sequência promotora é nativa para *I. orientalis*, *Pichia galeiformis*, *Pichia* sp. YB - 4149 (designação NERL), *Candida ethanolica*, *P. deserticola*, *P. membranifaciens* ou *P. fermentans*.

34. Vetor de transformação de levedura, de acordo com a reivindicação 32 ou 33, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o gene LDH exógeno é um gene LDH funcional que é pelo menos 35% idêntico a um gene L-LDH funcional de qualquer uma das espécies *Lactobacillus helveticus*, *L. casei*, *Bacillus Megaterium*, *Pediococcus acidilactici* ou *Rhizopus oryzae*.

35. Vetor de transformação de levedura, de acordo com a reivindicação 32 ou 33, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o gene LDH exógeno é um gene LDH funcional que codifica uma proteína pelo menos 35% idêntica àquela codificada por um gene L-LDH funcional de qualquer uma das espécies *Lactobacillus helveticus*, *L. casei*, *Bacillus megaterium*, *Pediococcus acidilactici* ou *Rhizopus oryzae*.

36. Vetor de transformação de levedura, de acordo com a reivindicação 32, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o gene LDH exógeno codifica uma proteína funcional que é pelo menos 60% idêntica a pelo menos uma dentre SEQ. ID. NO. 93,

SEQ. ID. NO. 94, SEQ. ID. NO. 95 ou SEQ. ID. NO. 96.

37. Vetor de transformação de levedura, de acordo com a reivindicação 32 ou 33, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o gene LDH exógeno é um gene D-LDH funcional que é pelo menos 45% idêntico a um gene D-LDH funcional de qualquer uma das espécies *L. helveticus*, *L. Johnsonii*, *L. bulgaricus*, *L. delbrueckii*, *P. acidilactici*, *L. plantarum* e *L. pentosus*.

38. Vetor de transformação de levedura, de acordo com a reivindicação 32 ou 33, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o gene LDH exógeno é um gene LDH funcional que codifica uma proteína pelo menos 45% idêntica àquela codificada por um gene D-LDH funcional de qualquer uma das espécies *L. helveticus*, *L. johnsonii*, *L. bulgaricus*, *P. acidilactici*, *L. delbrueckii*, *L. plantarum* e *L. pentosus*.

39. Vetor de transformação de levedura, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende um gene LDH cassette posicionado entre uma sequência acima (5'), bem como uma sequência abaixo (3'), o gene LDH cassette incluindo um gene lactato desidrogenase funcional funcionalmente ligado a um promotor e terminador que são, cada um, operantes em pelo menos uma espécie de levedura do clado *J. orientalis*/*P. fermentans* e as sequências acima (5') e abaixo (3') sendo acima e abaixo de regiões flanqueadoras para um gene nativo em uma espécie de levedura do clado *I. Orientalis*/*P. fermentans*.

40. Vetor de transformação de levedura, de acordo com a reivindicação 39, **CARACTERIZADO** pelo fato de que pelo menos um gene marcador cassette, que inclui um gene marcador funcionalmente ligado a uma sequência promotora e a uma se-

quência terminadora que são, cada uma, operantes em uma espécie de levedura do clado *J. orientalis*/*P. fermentans* também está posicionado entre as referidas sequências acima e abaixo.

5 41. Vetor de transformação de levedura, de acordo com a reivindicação 39 ou 40, **CARACTERIZADO** pelo fato de que as sequências acima e abaixo são regiões flanqueadoras 5'- e 3'-, respectivamente, de um gene piruvato descarboxilase de *I. orientalis*.

10 42. Vetor de transformação de levedura, de acordo com a reivindicação 39 ou 40, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o promotor do gene LDH cassete é um promotor que é nativo de um gene *I. orientalis*.

15 43. Célula de levedura geneticamente modificada de uma determinada espécie no clado *I. orientalis*/*P. fermentans*, **CARACTERIZADA** pelo fato de que tem a capacidade de produzir ácido lático.

20 44. Processo de fermentação, **CARACTERIZADO** pelo fato de que uma célula de levedura geneticamente modificada conforme definida na reivindicação 43 é cultivada sob condições de fermentação em um caldo de fermentação que inclui um açúcar fermentável para a produção de ácido lático ou de um sal do mesmo.

25 45. Célula geneticamente modificada, **CARACTERIZADA** pelo fato de que é de uma determinada espécie no clado *I. orientalis*/*P. Fermentans*.

Figura 1

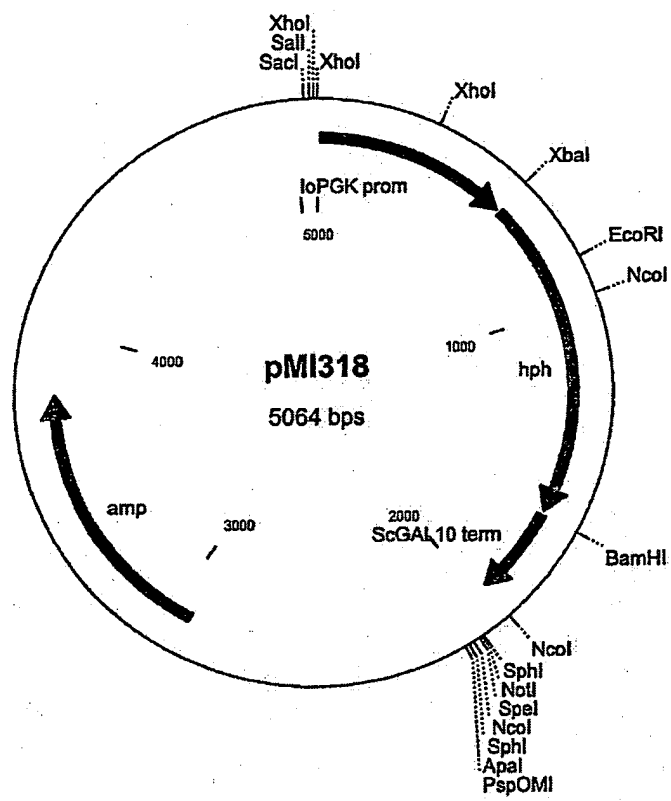


Figura 2

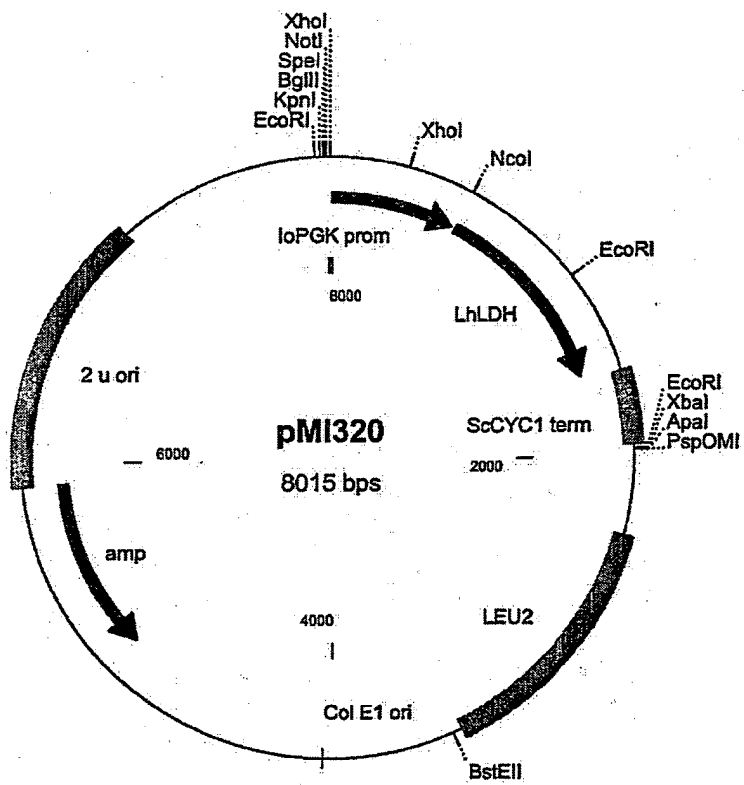


Figura 3

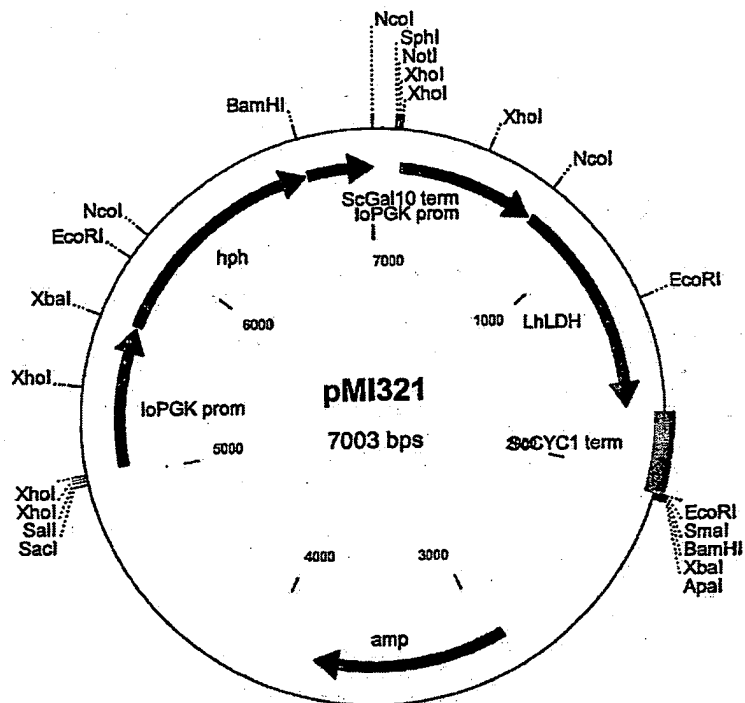


Figura 4

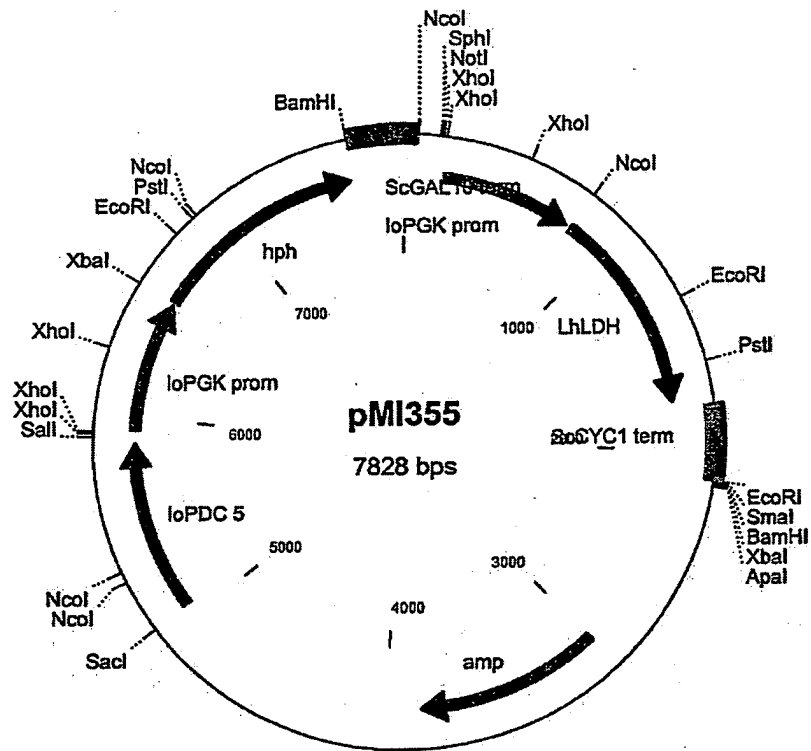


Figura 5

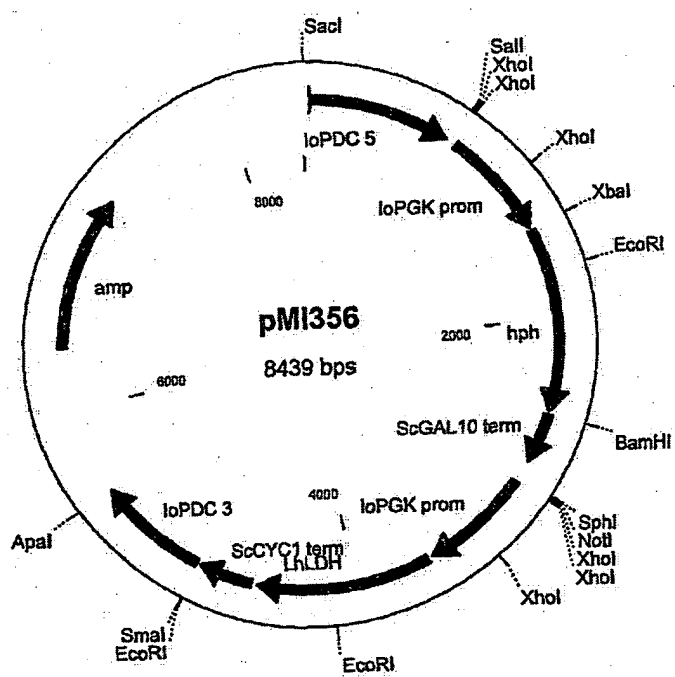


Figura 6

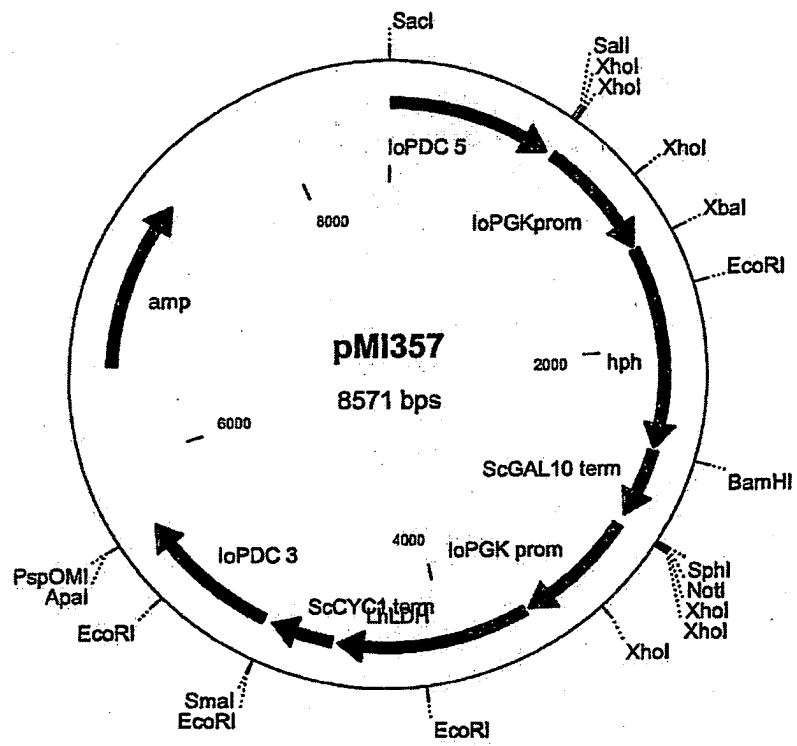


Figura 7

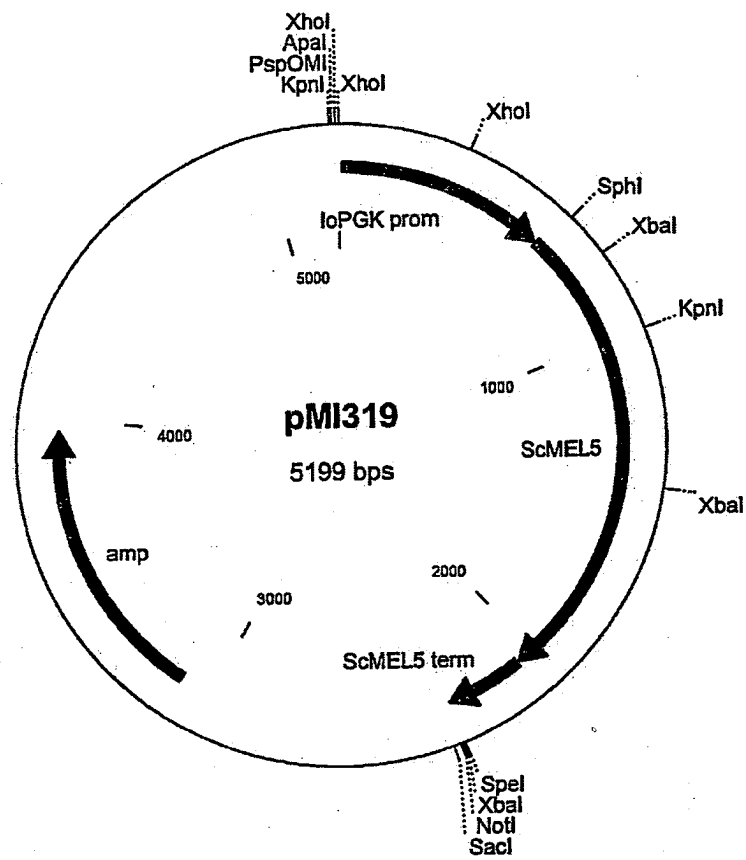


Figura 8

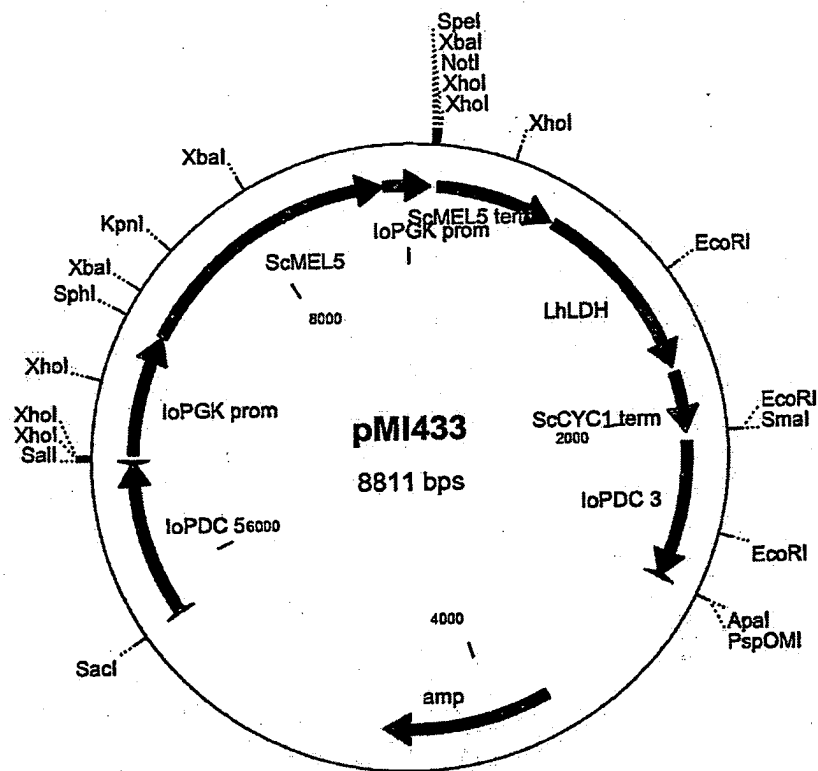


Figura 9

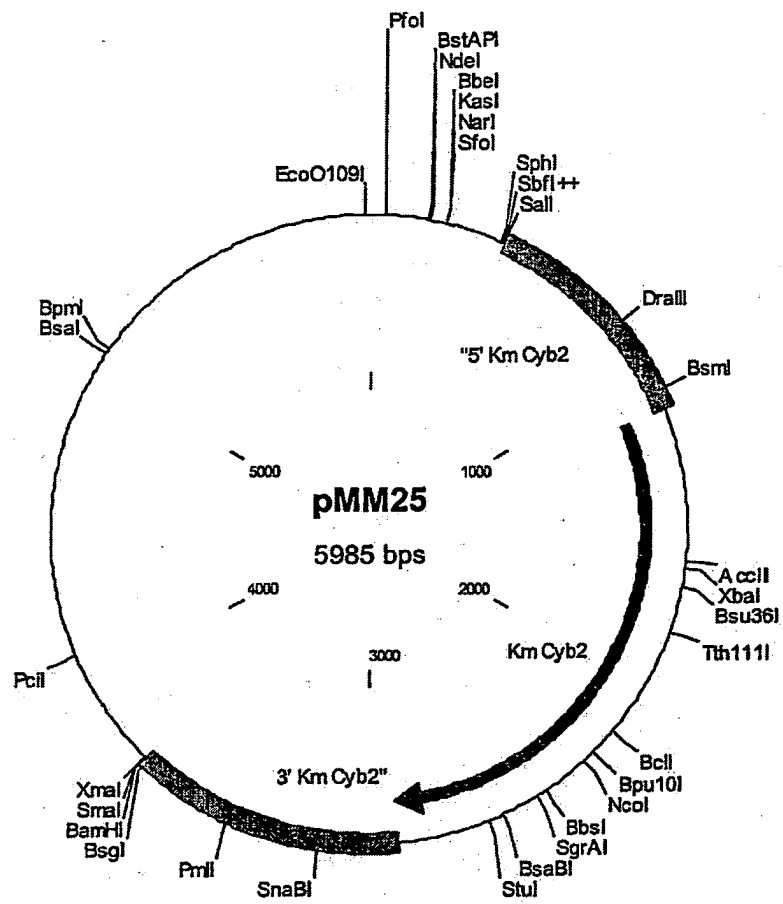


Figura 10

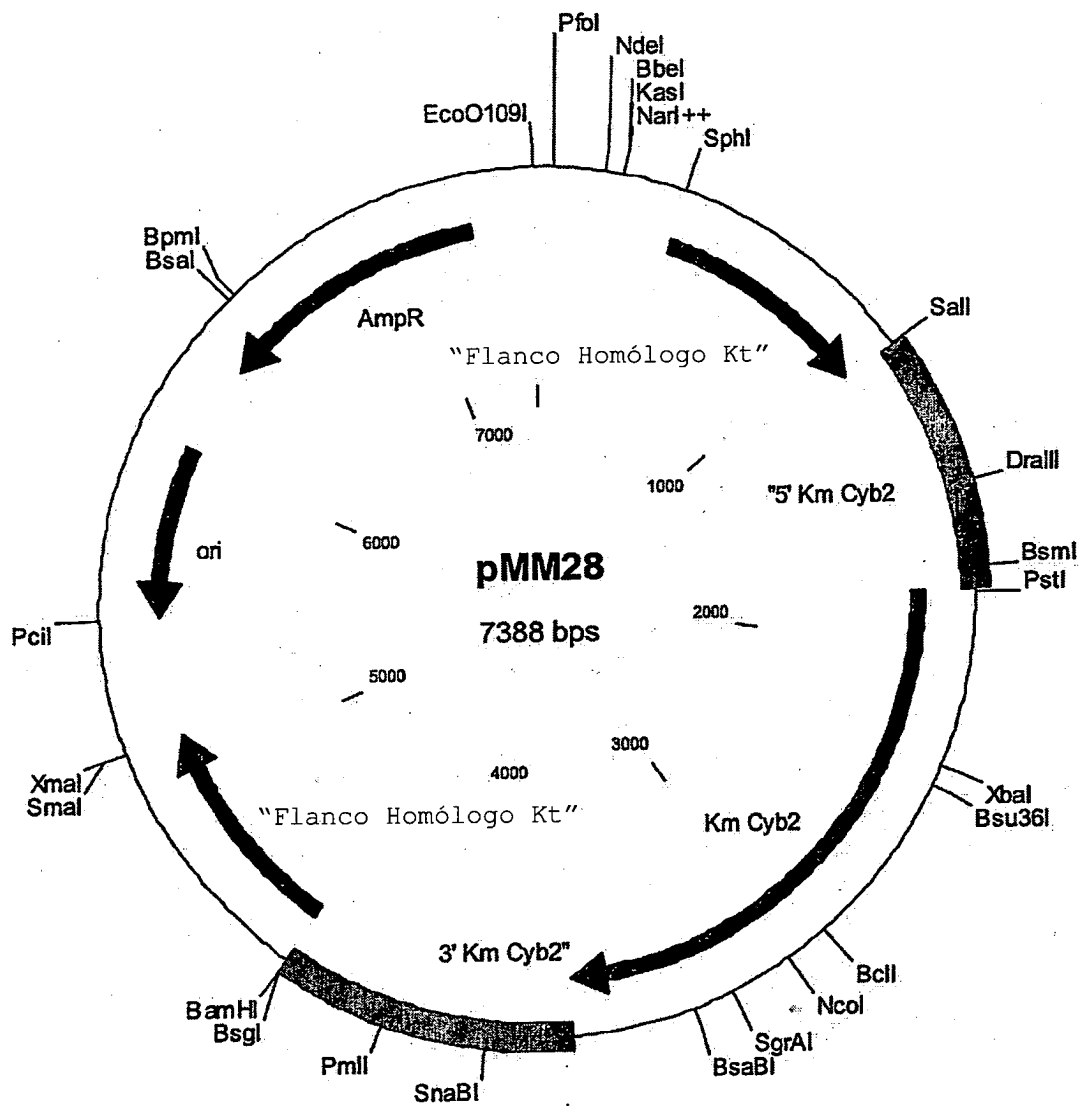


Figura 11

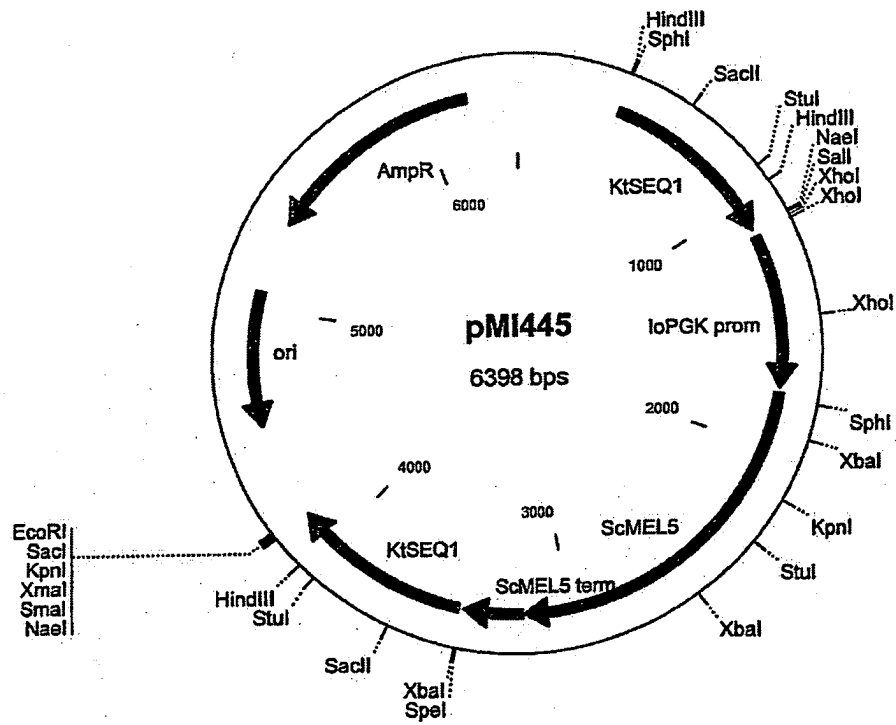


Figura 12

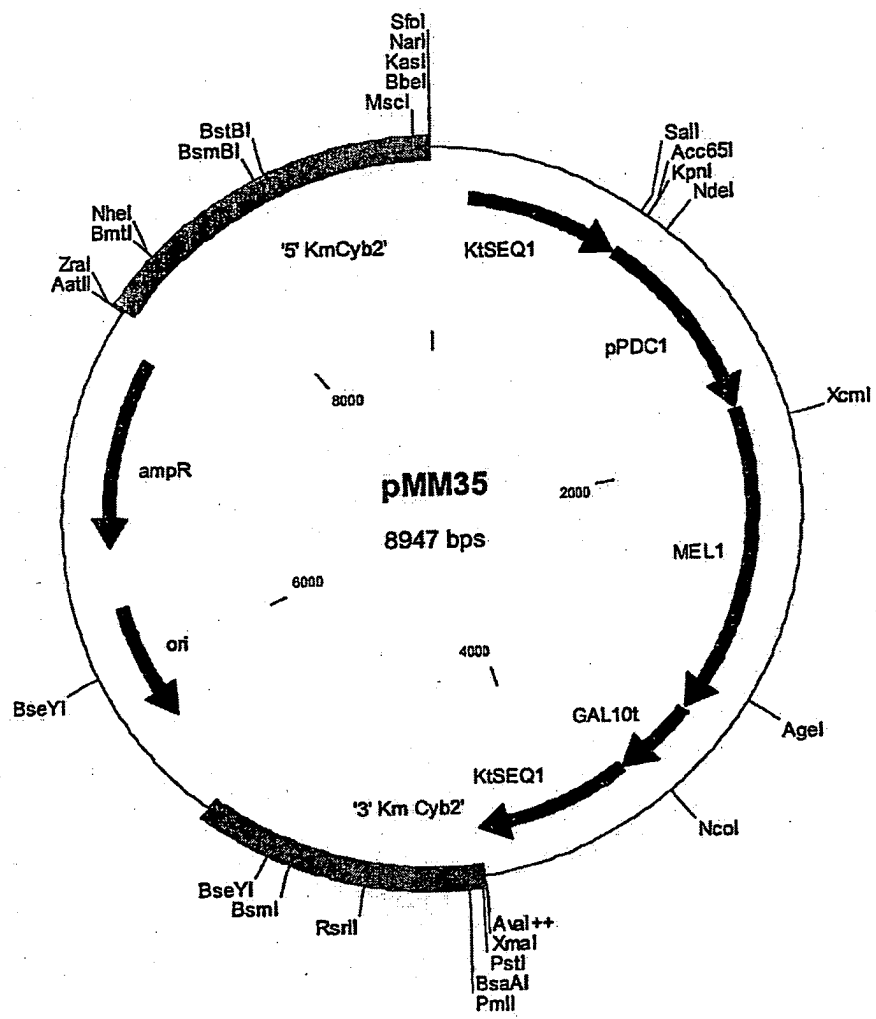


Figura 13

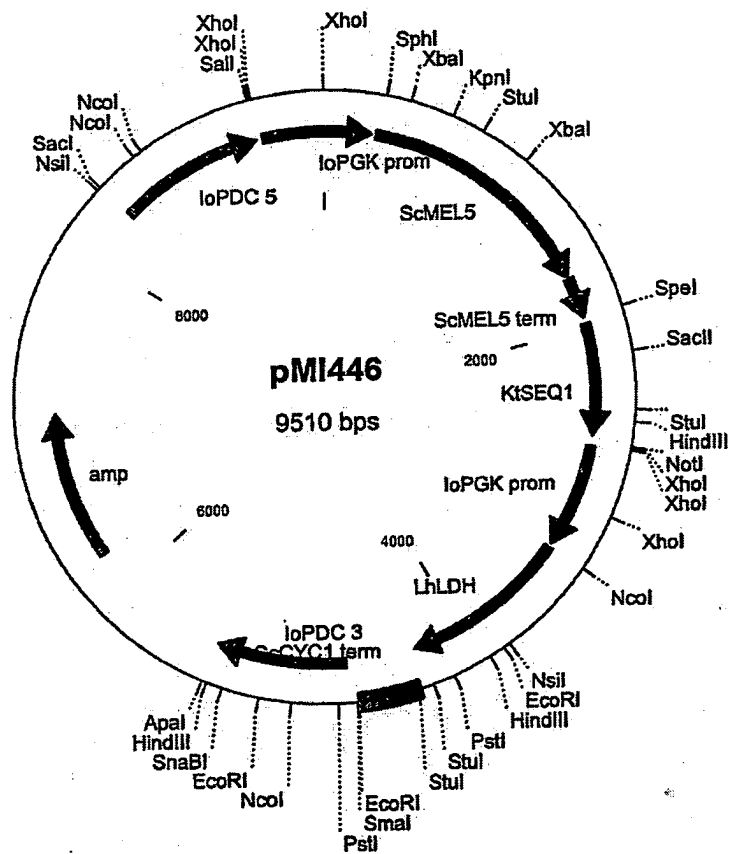


Figura 14

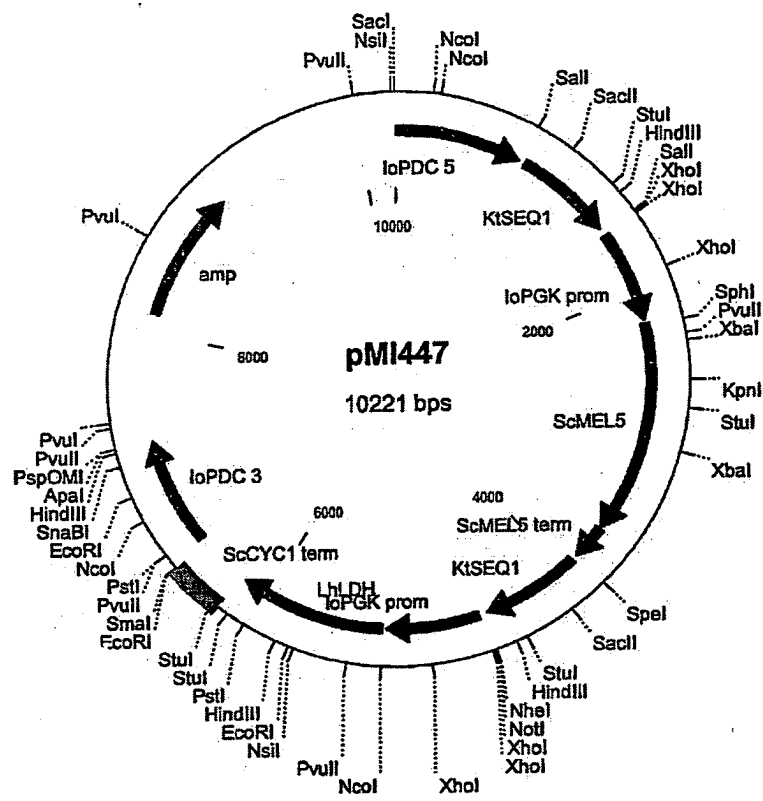


Figura 15

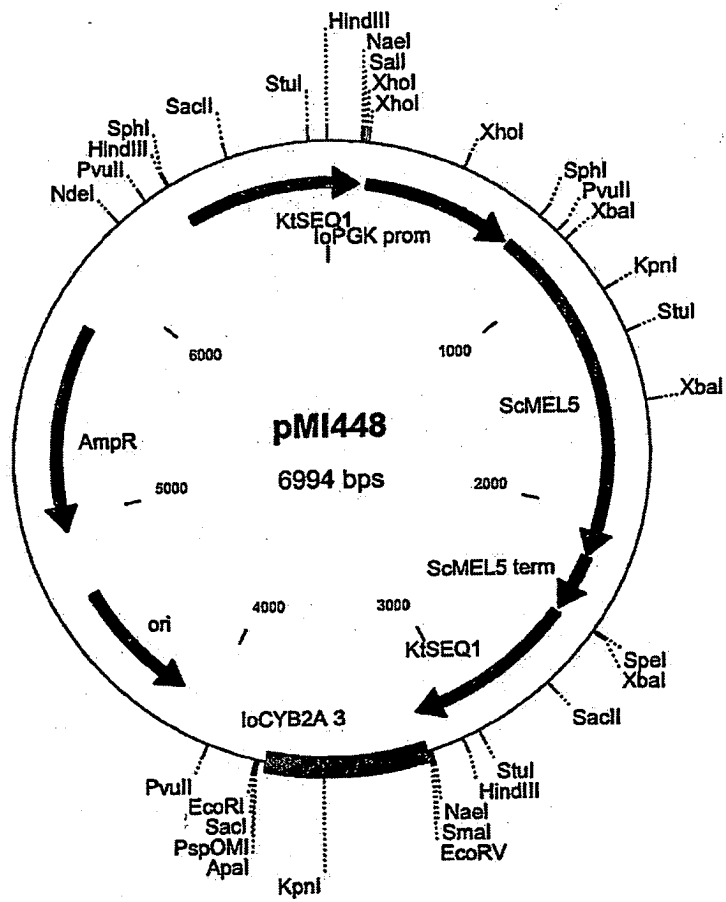


Figura 16

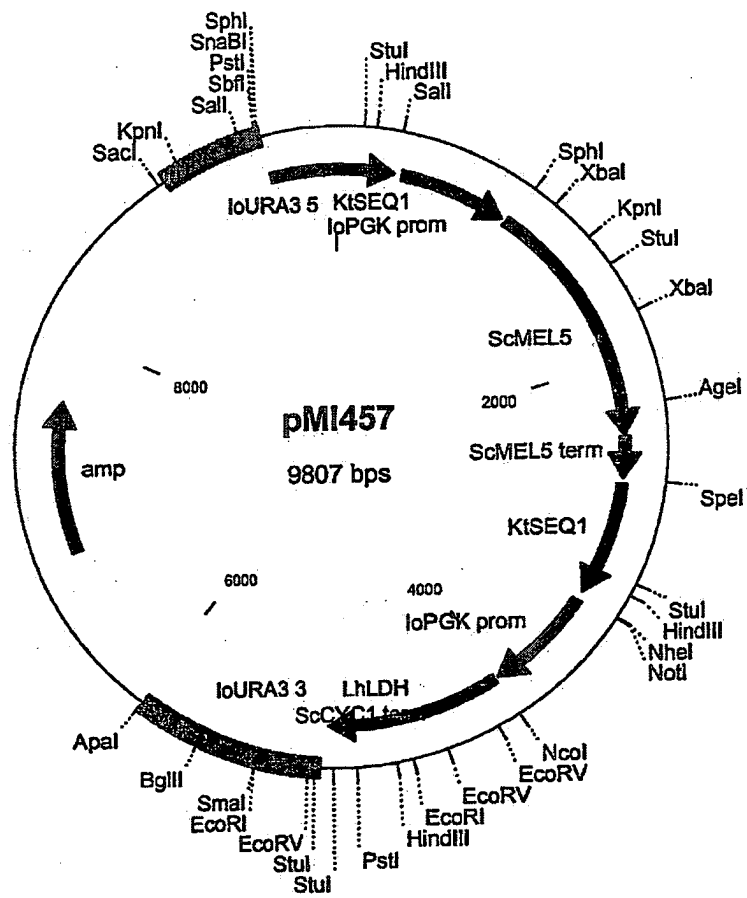


Figura 17

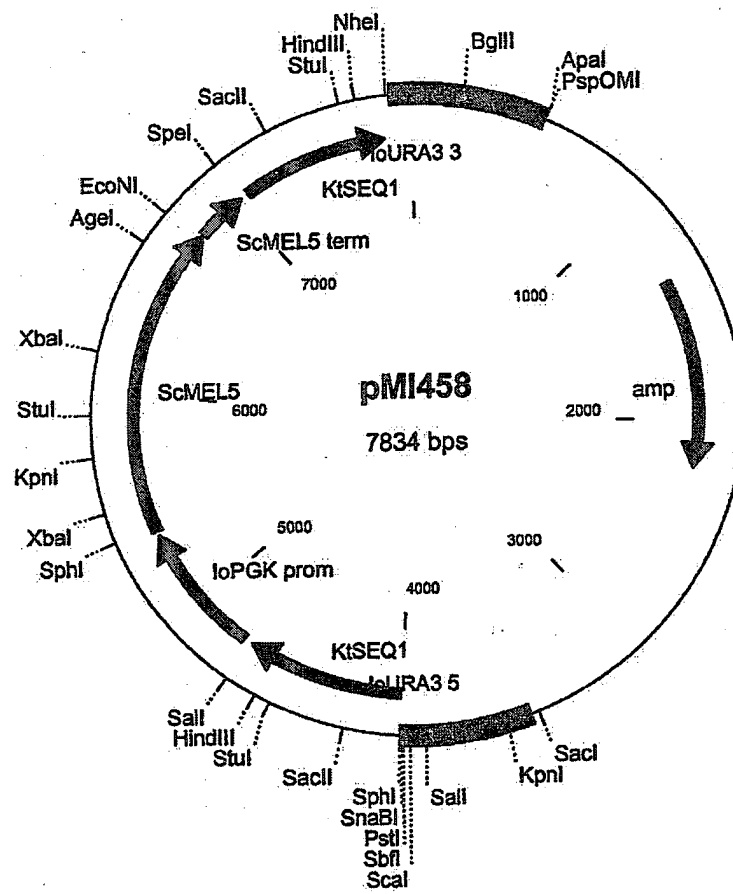


Figura 18

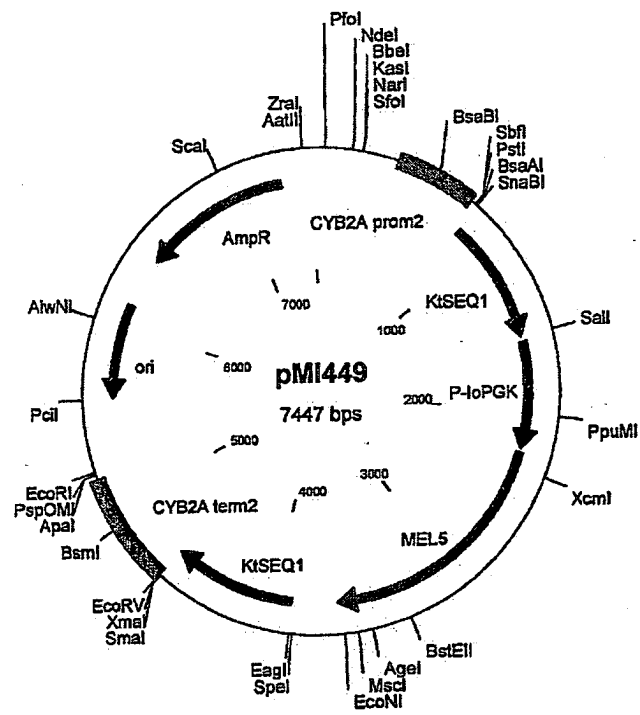


Figura 19

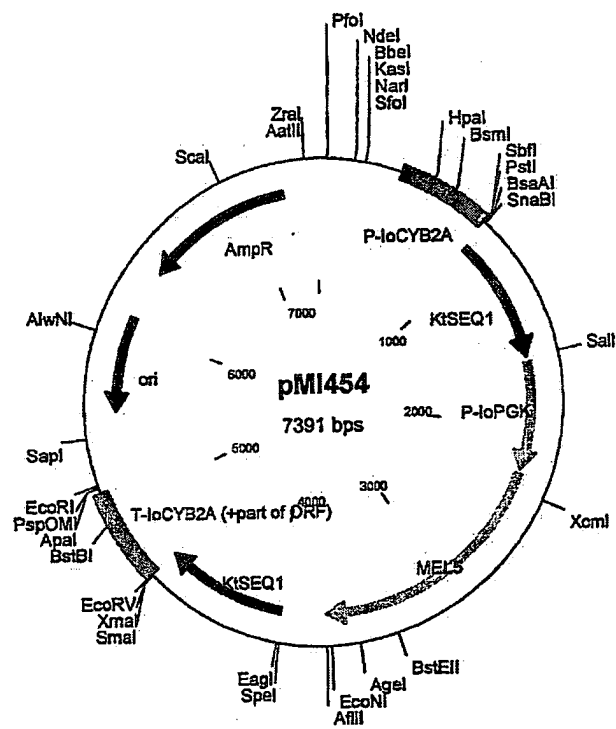


Figura 20

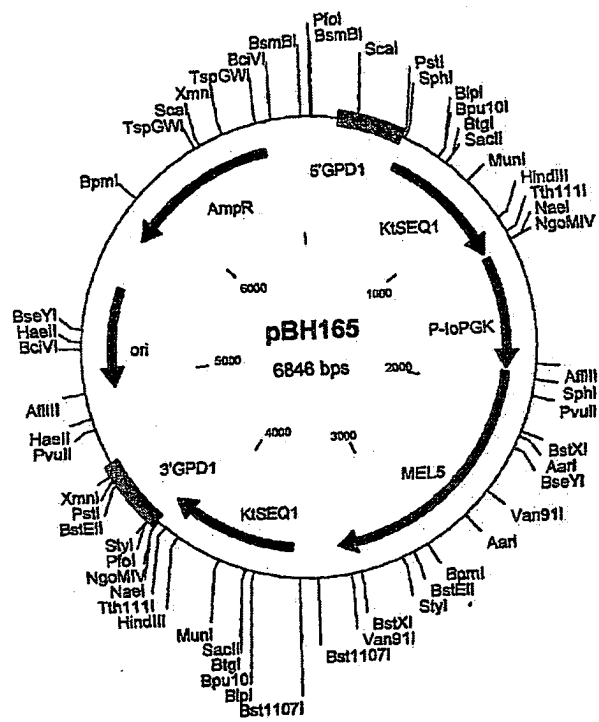
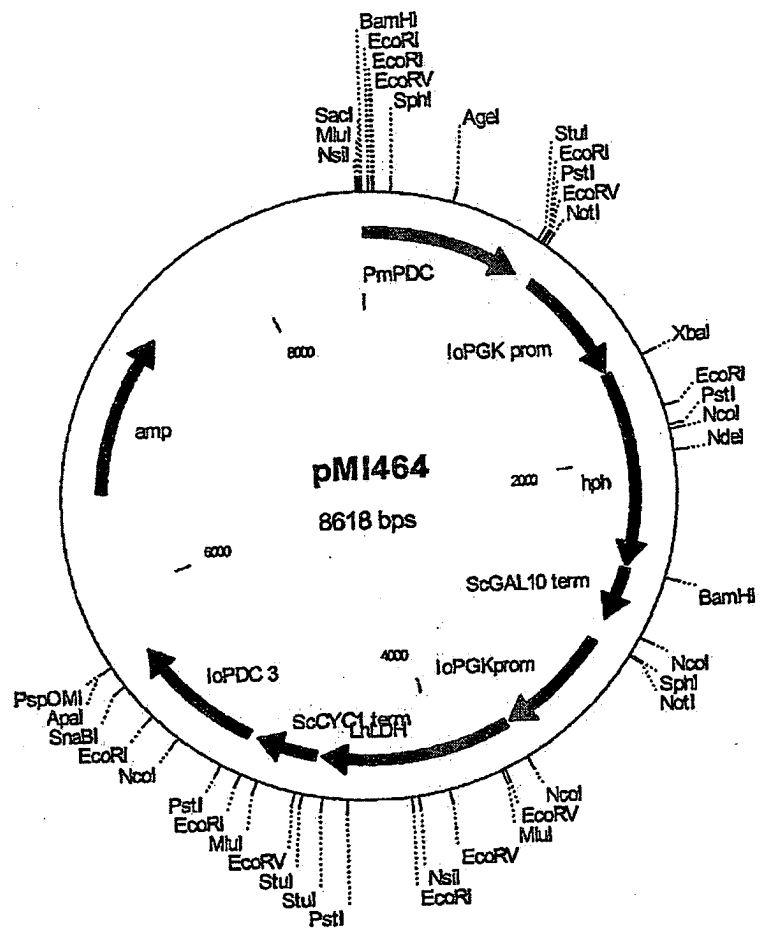


Figura 21



RESUMO

"LEVEDURA GENETICAMENTE MODIFICADA DA ESPÉCIE
ISSATCHENKIA ORIENTALIS E ESPÉCIES ESTREITAMENTE
RELACIONADAS E PROCESSOS DE FERMENTAÇÃO UTILIZANDO AS
5 MESMAS"

Células da espécie *Issatchenkia orientalis* e espé-
cies de levedura estreitamente relacionadas são transforma-
das com um vetor para introduzir um gene lactato desidroge-
nase exógeno. As células produzem ácido láctico de modo efi-
10 caz e são resistentes a baixo pH, condições de título de
lactato elevado.