

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

(21) **PI0709607-0 A2**

(22) Data de Depósito: 13/03/2007
(43) Data da Publicação: 19/07/2011
(RPI 2115)



(51) *Int.Cl.:*
A01N 63/00 2006.01
A01N 63/04 2006.01

(54) Título: **CÉDULAS DE LEVEDURA TENDO CAMINHO INTERROPIDO A PARTIR DE DIIDROXI ACETONA FOSFATO PARA GLICEROL**

(30) Prioridade Unionista: 13/03/2006 US 60/781.674

(73) Titular(es): Cargill, Inc.

(72) Inventor(es): Aristos Aristidou, Benjamin Matthew Hause, Brian J. Rush, Catherine Asleson Dundon, Kari Koivuranta, Kevin Roberg-Perez, Pirkko Suominen, Thomas Willian McMullin

(74) Procurador(es): Nellie Anne Daniel-shores

(86) Pedido Internacional: PCT US2007006408 de 13/03/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/106524 de 20/09/2007

(57) Resumo: CÉLULAS DE LEVEDURA TENDO CAMINHO INTERROMPIDO A PARTIR DE DIIDROXI ACETONA FOSFATO PARA GLICEROL. Células de levedura são geneticamente modificadas para interromper um caminho metabólico nativo a partir de diidroxí acetona para glicerol. Em certos aspectos, a célula de levedura é do gênero *Kluyveromyces Candida* ou *Issatchenkia*. Em outros aspectos, a célula de levedura é capaz de produzir pelo menos um ácido orgânico, tal como lactato. As células levedura produzem significativamente menos glicerol que as linhagens tipo selvagem, e usualmente produzem maiores rendimentos de desejados produtos de fermentação. Células de levedura da invenção freqüentemente crescem bem quando cultivadas, à despeito de sua reduzida produção de glicerol.



“CÉLULAS DE LEVEDURA TENDO CAMINHO INTERROMPIDO A PARTIR DE DIIDROXI ACETONA FOSFATO PARA GLICEROL”

Esta invenção foi realizada sob contrato N^o DE-FC36-03GO13145 com o United States Department of Energy. O governo dos Estados Unidos tem certos direitos desta invenção.

Este pedido reivindica prioridade de United States Provisional Application No. 60/781 674, depositado em 13 de março de 2006.

Esta invenção refere-se a certa levedura geneticamente modificada, e processos de fermentação para produção de ácido láctico usando aquelas leveduras geneticamente modificadas.

Leveduras são usadas como biocatalisadores em um número de fermentações industriais. Há um crescente interesse em uso de levedura para fermentar açúcares a ácidos orgânicos como ácido láctico. Na medida em que mais ácido orgânico é produzido nestas fermentações, o meio de fermentação se torna crescentemente ácido. Maioria de bactérias que produzem estes ácidos orgânicos não desempenham bem em ambientes fortemente ácidos – elas também não sobrevivem sob aquelas condições ou também produzem tão lentamente que o processo se torna economicamente inviável. Como um resultado, torna-se necessário tamponar o meio para manter um pH alto. Isto causa dificuldade na recuperação de produto em forma ácida. É preferido conduzir a fermentação em um menor pH no qual o produto está parcial ou inteiramente na forma ácida.

Espécies de levedura têm sido consideradas como candidatas para tais fermentações de baixo pH. Muitas espécies de levedura fermentam naturalmente açúcares hexose a etanol, mas poucas se alguma produz naturalmente rendimentos significantes de ácidos orgânicos como ácido láctico. Da mesma maneira, foram feitos esforços para modificar geneticamente várias espécies de leveduras para inserção de um ou mais genes que permitirão a célula produzir ácido láctico. De modo a desviar metabolismo de açúcar de produção de etanol para produção de ácido láctico, estas células também foram geneticamente modificadas para interromper ou suprimir o gene piruvato descarboxilase (PDC) nativo. 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 03/102201 A2.

Glicerol é produzido em significativo rendimento em muitas destas fermentações de levedura. Glicerol pode servir como um osmo-protetor para a célula. Formação de glicerol pode auxiliar regeneração de co-fatores de redox sob condições de fermentação.

Glicerol é produzido em muitas células de levedura através de metabolização de diidroxi acetona fosfato (DHAP). Em maior parte de espécies de levedura, DHAP é reduzido por uma glicerol-3-fosfato desidrogenase (GPD, nome sistemático enzima sn-glicerol-3-fosfato:NAD⁺ 2-óxido redutase, EC 1.1.1.8) para formar glicerol-3-fosfato (G3P). G3P serve

como um precursor para biossíntese de lipídeo assim como um precursor de glicerol. G3P é desfosforilado a glicerol por uma enzima glicerol-3-fosfatase (GPP, nome sistemático glicerol-1-fosfato fosfoidrolase, EC 3.1.3.21).

Existe um caminho alternativo para produção de glicerol, que é importante para algumas leveduras, como *S. pombe*. Neste caminho, diidroxi acetona fosfato é desfosforilado em diidroxi acetona através de diidroxi acetona fosfato fosfatase. Diidroxi acetona é então convertida em glicerol em conjunção com oxidação NADH por glicerol desidrogenase dependente de NADH⁺ (nome sistemático glicerol:NAD⁺ 2-óxido redutase, EC 1.1.1.6).

Devido produção de glicerol consumir carbono que de outro modo pode ser usado para produção de um produto de fermentação mais desejável, esta produção de glicerol representa uma significativa fonte de perda de rendimento. Em adição, produção de glicerol surge às custas de ambos, ATP e NADH. Isto direciona energia afastando-se da produção de biomassa ou o produto desejado. Por ambas razões, pode ser desejado reduzir-se ou eliminar-se produção de glicerol pela célula. Ainda uma consideração é que a redução ou eliminação de produção de glicerol pode simplificar recuperação e purificação do produto desejado.

Uma linhagem *Saccharomyces cerevisiae* foi geneticamente engenheirada para suprimir seus genes GPD nativos, assim privando a célula da enzima GPD e prevenindo produção de glicerol. Ver Nissen et al., "Anaerobic and aerobic batch cultivations of *Saccharomyces cerevisiae* mutants impaired in glycerol synthesis", *Yeast*, 2000:16:463-474. Nissen et al. relatam que as células de mutação cresceram muito pobremente sob ambas condições anaeróbicas e aeróbicas quando ambos dos genes GPD nativos foram interrompidos. De acordo com Nissen et al., as células de mutação produziram muito menos glicerol que as células tipo selvagem. Nissen et al. fizeram a hipótese de que o pobre crescimento visto nas linhagens deletantes duplas foi devido a um esgotamento de coleção de NAD⁺ de célula, porque produção de glicerol não foi disponível para oxidar NADH na célula.

Pode ser desejável prover uma célula de levedura que produza um desejado produto orgânico, que produz pouco ou nenhum glicerol, e que também cresça bem sob condições aeróbicas, condições anaeróbicas ou ambas condições aeróbica e anaeróbica.

Em um aspecto, esta invenção é uma célula de levedura mutante de uma espécie de levedura de duplicação de genoma pré-total, tendo uma supressão ou interrupção de um caminho metabólico nativo a partir de diidroxi acetona fosfato para glicerol. A supressão ou interrupção do caminho metabólico nativo pode incluir uma supressão ou interrupção de pelo menos um gene glicerol-3-fosfato desidrogenase (GPD) nativo. A supressão ou interrupção do caminho metabólico nativo pode incluir uma supressão ou interrupção de pelo menos um gene glicerol-3-fosfatase (GPP) nativo. Ela pode incluir uma supressão ou interrupção de pelo menos um gene glicerol-3-fosfato desidrogenase (GPD) nativo e pelo menos

um gene glicerol-3-fosfatase (GPP) nativo. A supressão ou interrupção do caminho metabólico nativo pode incluir uma supressão ou interrupção de pelo menos um gene diidrox acetona fosfato fosfatase nativo, gene glicerol desidrogenase nativo, ou ambos.

Em um outro aspecto, esta invenção é uma célula de levedura mutante de uma espécie de levedura de duplicação de genoma pré-total, cuja célula mutante produz menos que 2,0 g/L de glicerol quando cultivada sob as seguintes condições micro-aeróbicas padrões:

A.meio aquoso definido contendo, no início de cultura, 5 g/L de sulfato de amônio, 3 g/L de diidrogeno fosfato de potássio, 0,5 g/L de sulfato de magnésio, elementos em traços, vitaminas, 150 g/L de glicose;

B.pH no início de cultura de 3,5, com meio de fermentação sendo tamponado se necessário para prevenir queda do pH abaixo de 3,0 ou elevação acima de 7,0 durante a cultura;

C.Cultura inoculada com a célula de levedura para uma OD₆₀₀ de 1,0;

D.Temperatura de cultura de 30°C;

E.Cultura continuada até concentração de glicose ser reduzida para 10 g/L, mas não é continuada por mais de 120 horas;

F.Aeração e agitação suficientes para produzir uma taxa de tomada de oxigênio de 5,0+/-1,0 mmoles/L/h.

Em um outro aspecto, esta invenção é uma célula de levedura mutante de uma espécie de levedura de duplicação de genoma pré-total, que carece de habilidade para produzir uma enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase (GDP) ativa. Para propósitos desta invenção, uma célula é considerada carecer de habilidade para produzir uma enzima ativa se a atividade de tal enzima na célula é reduzida por pelo menos 75%, preferivelmente pelo menos 90%, comparada à atividade daquela enzima na linhagem tipo selvagem. Atividade de enzima de qualquer enzima particular pode ser determinada usando apropriados processos de ensaio. Kits de ensaio comerciais são disponíveis para determinação de atividade de glicerol-3-fosfato desidrogenase. Um exemplo de um tal produto é designado como MK426 por Takara Bio, Inc. e é disponível através de Fisher Scientific, Pennsylvania.

Em um outro aspecto, esta invenção é uma célula de levedura mutante de uma espécie de levedura de duplicação de genoma pré-total, que carece de habilidade para produzir uma enzima glicerol-3-fosfatase ativa.

Em um outro aspecto, esta invenção é uma célula de levedura mutante que carece de habilidade para produzir uma enzima diidrox acetona fosfato fosfatase ativa que é nativamente produzida por células tipo selvagem das espécies de levedura, carece de habilidade para produzir uma enzima glicerol desidrogenase dependente de NADH⁺ ativa que é nativamente produzida por células tipo selvagem das espécies de levedura, ou ambas.

Em um outro aspecto, esta invenção é uma célula de levedura mutante que é geneticamente modificada para produzir um produto ácido orgânico, a dita célula de levedura tendo uma supressão ou interrupção de um caminho metabólico nativo a partir de diisroxi acetona fosfato para glicerol e uma supressão ou interrupção de um caminho metabólico nativo a partir de piruvato para etanol. A supressão ou interrupção do caminho metabólico nativo pode incluir uma supressão ou interrupção de pelo menos um gene glicerol-3-fosfato desidrogenase nativo. A supressão ou interrupção do caminho metabólico nativo pode incluir uma supressão ou interrupção de pelo menos um gene glicerol-3-fosfatase nativo. Ela pode incluir uma supressão ou interrupção de pelo menos um gene glicerol-3-fosfato desidrogenase nativo e pelo menos um gene glicerol-3-fosfatase nativo.

Células de acordo com a invenção foram verificadas produzirem níveis muito baixos de glicerol quando cultivadas sob condições de fermentação. Produção de glicerol foi verificada estar abaixo de 0,2 g/L sob uma faixa de condições de fermentação. Surpreendentemente, as células da invenção crescem bem sob condições de fermentação, à despeito de falta de produção de glicerol e em algumas realizações à despeito de falta de produção de glicerol-3-fosfato. As células da invenção também foram verificadas terem aperfeiçoada tolerância a ácido em alguns exemplos. Da mesma maneira, a invenção é também um processo de fermentação onde uma célula de qualquer um dos aspectos anteriores da invenção é cultivada sob condições de fermentação para produzir um produto de fermentação, onde o rendimento de fonte de carbono para glicerol é de menos que 2% em peso.

A Figura 1 é um diagrama mostrando o plasmídeo pBH158.

A Figura 2 é um diagrama mostrando o plasmídeo pBH159.

A Figura 3 é um diagrama mostrando o plasmídeo pBH160.

A Figura 4 é um diagrama mostrando o plasmídeo pBH161.

A Figura 5 é um diagrama mostrando o plasmídeo pMM28.

A Figura 6 é um diagrama mostrando o plasmídeo pMI318.

A Figura 7 é um diagrama mostrando o plasmídeo pMI321.

A Figura 8 é um diagrama mostrando o plasmídeo pMI355.

A Figura 9 é um diagrama mostrando o plasmídeo pMI357.

A Figura 10 é um diagrama mostrando o plasmídeo pMI433.

A Figura 11 é um diagrama mostrando o plasmídeo pMI449.

A Figura 12 é um diagrama mostrando o plasmídeo pMI454.

A Figura 13 é um diagrama mostrando o plasmídeo pBH165.

A Figura 14 é um diagrama mostrando o plasmídeo pTMC61.

As células de levedura da invenção são obtidas através de realização de certas modificações genéticas para uma célula de levedura hospedeira. A célula de levedura hospedeira é uma que, como uma linhagem tipo selvagem, é nativamente capaz de metabolizar

pelo menos um açúcar a glicerol. O caminho metabólico nativo pode envolver um caminho metabólico a partir de diidroxi acetona fosfato para glicerol-3-fosfato para glicerol. O caminho nativo pode envolver um caminho metabólico de diidroxi acetona fosfato para diidroxi acetona para glicerol. Células hospedeiras podem conter ambos daqueles caminhos metabólicos nativos.

O termo “nativo”, quando usado aqui com relação a materiais genéticos (por exemplo, um gene, promotor, terminador ou outra sequência de ADN), refere-se a materiais genéticos que são encontrados (à parte de mutações de indivíduo-para-indivíduo que não afetam função) dentro do genoma de células tipo selvagem daquelas espécies de levedura. “capacidade nativa” (e suas variações tal como “nativamente capaz” indica a habilidade de células tipo selvagem para realizar a função indicada. Por exemplo, uma célula é nativamente capaz de metabolizar um açúcar a glicerol se células tipo selvagem daquelas espécies que possuem esta capacidade antes de quaisquer modificações genéticas. Um gene é considerado ser “funcional” dentro de uma célula se ele funciona dentro da célula para produzir uma proteína ativa. Um “caminho nativo” ou “caminho metabólico nativo” refere-se a um caminho metabólico que existe e é ativo em células tipo selvagem daquelas espécies de levedura. Uma enzima é “nativamente produzida” por um espécie de levedura se a enzima é produzida em forma ativa por células tipo selvagem daquela espécie de levedura.

Nesta invenção, “exógeno” significa com relação a qualquer material genético que ele não é nativo para a célula hospedeira.

Apropriadas células hospedeiras para certas realizações da invenção incluem células de levedura que não descendem de uma linha que sofreu o antigo evento de duplicação de genoma total (~100 milhões de anos atrás) descrito por Wolf et al., “Molecular evidence for the ancient duplication of the entire yeast genome”, *Nature* 387, 708-713 (1997) (daqui por diante “Wolf et al. 1997”), Langkjaer et al., et al., “Yeast genome duplication was followed by asynchronous differentiation of duplicated genes”, *Nature* 421, 848-852 (2003) e Merico et al., “Fermentative lifestyle in yeasts belonging to the *Saccharomyces* complex”, *FEBS Journal* 274, 967-989 (2007) (daqui por diante “Merico 2007”). Tais células de levedura ao invés descendem de uma ou mais outras linhas de células de leveduras que existiram no momento do evento de duplicação de genoma total, e são aqui referidas como “levedura de duplicação de genoma pré-total”. O evento de duplicação de genoma total é visto como crítico para a evolução das capacidades de fermentação de *Saccharomyces cerevisiae* e outras espécies descendentes do ancestral comum no qual a duplicação de genoma ocorreu (Merico 2007). Incluídos no conjunto de genes duplicados na duplicação de genoma estão aqueles codificando glicerol-3-fosfato desidrogenase e glicerol-3-fosfatase, como são genes codificando fumarato redutase que também está envolvida em manutenção de equilíbrio redox (Wolfe et al 1997).

Entre as apropriadas células de levedura de duplicação de genoma pré-total estão células de levedura hemiascomicetosas. Levedura hemiascomicetosa são leveduras de célula simples classificadas dentro da ordem Saccharomycetales.

Outras células de leveduras apropriadas incluem aquelas caindo dentro de qualquer uma das clades 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 ou 14 do complexo *Saccharomyces*, como descrito na Figura 9 (p. 430) de Kurtzman and Robnett, "Phylogenetic relationships among yeasts of the 'Saccharomyces complex' determined from multigene sequence analyses", FEMS Yeast Res. Vol. 4, pp. 417-432 (2003), aqui incorporado por referência. Aquelas clades são designadas pelos nomes *Zygosaccharomyces*, *Zygoturulaspora*, *Torulaspora*, *Lachancea*, *Kluyveromyces*, *Eremothecium*, *Hanseniaspora*, e *Saccharomycodes*, respectivamente, em Merico 2007 supra, e em Kurtzmann, "Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and other members of the Saccharomycetaceae..." FEMS Yeast. Res. Vol. 4, pp. 233-245 (2003) (daqui por diante "Kurtzman 2003").

Outras células de levedura apropriadas incluem (mas não são limitadas a) células de leveduras classificadas sob os gêneros *Candida*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Issatchenkia*, e *Hansenula*.

Uma classe de células hospedeiras que são de particular interesse inclui qualquer uma daquelas de uma espécie contida em clade I. *orientalis* / I. *terrícola*. Membros da clade I. *orientalis* / I. *terrícola* são identificados por análises do domínio D1/D2 variável do ADN ribossômico 26S de espécies de leveduras, usando o processo descrito por Kurtzman and 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, aqui incorporado por referência (daqui por diante "Kurtzman and Robnett 1998"). Ver especialmente, p. 349 e 361. Análise do domínio D1/D2 variável do ADN ribossômico 26S de centenas de ascomicetes revelou que a clade I. *orientalis* / I. *terrícola* contém espécies relacionadas de perto. Membros da clade I. *orientalis* / I. *terrícola* exibem maior similaridade no domínio D1/D2 variável do ADN ribossômico 26S para aquele de outros membros da clade do que para aquela de espécies de leveduras fora da clade. Por isso, outros membros da clade I. *orientalis* / I. *terrícola* podem ser identificados através de comparação dos domínios D1/D2 de seu respectivo ADN ribossômico e comparando àquele de outros membros da clade e espécies relacionadas de perto fora da clade, usando processos de Kurtzman and Robnett. Espécies de leveduras dentro de clade I. *orientalis* / I. *terrícola* são todas as leveduras hemiascomicetosas dentro da clade *Pichia* / *Issatchenkia* / *Saturnispora* / *Dekkera* mais ampla. Uma outra classe de células hospedeiras de interesse é a clade I. *orientalis* / *P. fermentans* como descrita por Kurtzman and Robnett 1998. Esta clade é a clade mais importante que contém pelo menos as espécies *Issatchenkia orientalis*, *Pichia galeiformis*, *Pichia* sp. YB-4149 (designação NRRL), *Candida ethanolica*, *P. deserticola*, *P. membranifera*.

ciens e *P. fermentans*.

Outras células hospedeiras de particular interesse são quaisquer daquelas de espécies contidas na clade *Kluyveromyces* de complexo *Saccharomyces*, como descrito (como Clade 11) na Figura 9 (p. 430) de Kurtzman and Robnett, "Phylogenetic relationships among yeasts of the 'Saccharomyces complex' determined from multigene sequence analyses". FEMS Yeast Res. Vol. 4, pp. 417-432 (2003), aqui incorporado por referência, e na Figura 1 de Kurtzmann, "Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and other membris of the *Saccharomycetaceae*..." FEMS Yeast. Res., Vol. 4, pp. 233-245 (2003) (daqui por diante "Kurtzman 2003"), aqui incorporado por referência. A clade *Kluyveromyces* inclui pelo menos as espécies *S. kluyveri*, *K. aestuarii*, *K. nonfermentans*, *K. lactic*, *K. marxianus* e *K. dobzhanskii*, e pode incluir adicionais espécies classificáveis dentro desta clade usando os processos de análise de seqüência de multi-genes descritos em Kurtzman 2003.

Tais células de leveduras são de particular interesse quando geneticamente modificadas para produção de um ácido orgânico, especialmente lactato. Células hospedeiras dos gêneros *Candida*, *Kluyveromyces* and *Ittatchenkia* são genericamente preferidas. Células hospedeiras das clades *Kluyveromyces* e *I. orientalis* / *P. fermentans* descritas anteriormente são particularmente preferidas, naquelas realizações onde a célula mutante produz um ácido orgânico, assim como em casos onde a célula mutante produz um outro produto de fermentação (tal como, por exemplo, etanol) em adição a ou ao invés de um ácido orgânico. Células hospedeiras especialmente preferidas são *C. sonorensis*, *K. marxianus*, *K. thermotolerans*, *C. methanosorbosa*, e *I. orientalis*. Células mais preferidas são *K. marxianus*, *C. sonorensis*, e *I. orientalis*. Quando primeiro caracterizada, a espécie *I. orientalis* recebeu o nome *Pichia kudriavzevii*. O anamorfo (forma assexual) de *I. orientalis* é conhecida como *Candida krusei*. Apropriadas linhagens de *K. marxianus* e *C. sonorensis* incluem aquelas descritas em WO 00/71738 A1, WO 02/42471 A2, WO 03/049525 A2, WO 03/102152 A2, e WO 03/102201 A2. Linhagens apropriadas de *I. orientalis* são linhagem ATCC 32196 e linhagem ATCC PTA-6648.

Por "supressão ou interrupção" de um caminho metabólico, é pretendido que o caminho é tanto feito completamente inoperante, como também sua atividade é reduzida por pelo menos 75%, preferivelmente pelo menos 90%, em relação à célula tipo selvagem. Atividade de um caminho pode ser reduzida através de redução de quantidade de enzima ativa que é produzida, através de redução de atividade da enzima que é produzida, ou alguma combinação de ambas. Por "supressão ou interrupção" de um gene é pretendido que a inteira região codificante do gene seja eliminada (supressão), ou a região dificante do gene, seu promotor, e/ou região terminadora é modificada (tal como por supressão, inserção, ou mutação) de modo que o gene não mais produz uma enzima ativa, o gene produz uma quantidade severamente reduzida (redução de pelo menos 75%, preferivelmente redução de pelo

menos 90%) da enzima ativa, ou o gene produz uma enzima com atividade severamente reduzida (pelo menos 75% reduzida, preferivelmente pelo menos 90% reduzida).

Na maioria dos casos, a supressão ou interrupção do caminho metabólico nativo envolverá uma supressão ou interrupção de pelo menos um gene GPD, pelo menos um gene GPP, ou ambos. Em células como *S. pombe*, que têm um caminho metabólico alternativo baseado em diidroxacetona fosfato fosfatase e glicerol desidrogenase, a supressão ou interrupção do caminho metabólico nativo usualmente incluirá uma supressão ou interrupção do gene diidroxacetona fosfato fosfatase, gene glicerol desidrogenase, ou ambos. Em células tendo ambos caminhos, supressões ou interrupções de ambos caminhos podem ser realizadas.

Os termos “gene glicerol-3-fosfato desidrogenase” e “gene GPD” são aqui usados para referirem-se a (a) qualquer gene que codifica uma proteína com atividade glicerol-3-fosfato desidrogenase e/ou (b) qualquer seqüência de ADN cromossômico que codifica uma enzima que é pelo menos 50%, preferivelmente pelo menos 60% e mais preferivelmente pelo menos 65% idêntica a qualquer uma das seqüências de aminoácidos identificadas como SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, ou 7. “Atividade glicerol-3-fosfato desidrogenase” refere-se à habilidade de uma proteína catalisar a reação de DHAP a glicerol-3-fosfato. Para propósitos desta invenção, porcentagem de identidade de seqüências de aminoácidos de ADN, ARN ou proteínas podem ser convenientemente computadorizadas usando BLAST (NCBI Basic Local Alignment Search Tool) version software 2.2.1 com parâmetros default. Seqüências tendo um escore de identidade de pelo menos XX%, usando o algoritmo BLAST version 2.2.13 com parâmetros default, são consideradas pelo menos XX% idênticas. O software BLAST é disponível do National Center for Biological Information, Bethesda, Maryland.

Similarmente, “gene glicerol-3-fosfatase” e “gene GPP” são aqui usados para designarem (a) qualquer gene que codifica uma proteína com atividade glicerol-3-fosfatase e/ou (b) qualquer seqüência de ADN cromossômico que codifica uma proteína que é pelo menos 50%, preferivelmente pelo menos 60%, e mais preferivelmente pelo menos 65% idêntica a qualquer uma das seqüências de aminoácidos identificadas como SEQ ID NOs: 8, 9, 10, 11 ou 12. “Atividade glicerol-3-fosfatase” refere-se à habilidade de uma proteína catalisar a desfosforilação de glicerol-3-fosfato para formar glicerol.

O termo gene “diidroxacetona fosfato fosfatase” é aqui usado para representar qualquer gene que codifica uma proteína com atividade diidroxacetona fosfato fosfatase. Gene “glicerol desidrogenase” é aqui usado para representar (a) qualquer gene codificando uma proteína com atividade glicerol desidrogenase e/ou (b) qualquer seqüência de ADN cromossômico que codifica uma proteína que é pelo menos 50%, preferivelmente pelo menos 60% e mais preferivelmente pelo menos 65% idêntica à seqüência de aminoácidos identificada como SEQ ID NO:13. “Atividade diidroxacetona fosfato fosfatase” refere-se à habi-

lidade de uma proteína catalisar a reação de diidroxí acetona fosfato e diidroxí acetona. “Atividade glicerol desidrogenase” refere-se à habilidade de uma proteína catalisar a redução de diidroxí acetona a glicerol.

A supressão ou interrupção de qualquer um dos genes anteriores pode ser realizada através de evolução forçada, mutagênese, ou processos de engenharia genética, seguido por apropriada seleção ou peneiramento para identificar os desejados mutantes.

Em processos de mutagênese células são expostas a radiação ultravioleta ou uma substância mutagênica, sob condições suficientes para obter uma alta taxa de eliminação (60-99,9%, preferivelmente 90-99,9%) das células. Células sobreviventes são então revestidas e selecionadas ou peneiradas para células tendo a atividade metabólica suprimida ou interrompida. Células tendo a desejada mutação podem ser selecionadas nas bases de sua reduzida habilidade para produzir glicerol. Interrupção ou supressão de qualquer um dos genes anteriores pode ser confirmada através de processos de análises de PCR ou Southern.

Engenharia genética para suprimir ou interromper o caminho metabólico para glicerol é convenientemente realizada em uma ou mais etapas via o desenho e construção de apropriadas construções de supressão e transformação da célula hospedeira com aquelas construções. O termo “construção” é aqui usado para representar uma seqüência de ADN que é usada para transformar uma célula. A construção pode ser, por exemplo, na forma de um plasmídeo circular ou vetor, na forma de um plasmídeo linearizado ou vetor, pode ser uma porção de um plasmídeo circular ou vetor (tal como é obtido através de digestão de plasmídeo ou vetor com uma ou mais enzimas de restrição), ou pode ser um produto PCR preparado usando um plasmídeo ou vetor como um molde. Seleção ou peneiramento se segue para identificar transformantes bem sucedidos. Processos de eletroporação e/ou de transformação química (tal como baseado em cloreto de cálcio – ou acetato de lítio) podem ser usados.

A seguinte discussão de construção de supressão é igualmente aplicável à supressão ou interrupção de qualquer um dos genes glicerol-3-fosfato desidrogenase, glicerol-3-fosfatase, diidroxí acetona fosfato fosfatase ou glicerol desidrogenase.

Uma construção de supressão é convenientemente montada através de primeiro clonagem de duas seqüências de ADN do gene alvo e/ou suas regiões flanqueantes à montante (5') ou à jusante (3'). As seqüências são preferivelmente não-contíguas, mas podem ser contíguas se adicional material genético (tal como um cassete marcador de seleção) é para ser interposto entre as mesmas na construção. Neste contexto, “não-contígua” significa que as seqüências de ADN não são imediatamente adjacentes umas às outras no genoma tipo selvagem, mas ao invés são separadas umas das outras no genoma tipo selvagem por uma área que é para ser suprimida de modo a suprimir ou interromper o gene. Seqüências

“contíguas” são diretamente adjacentes umas às outras no genoma tipo selvagem. Uma das seqüências pode incluir uma região 5’ para o promotor do gene alvo, toda ou uma porção da região promotora, toda ou uma porção da região de codificação de gene alvo, ou alguma combinação das mesmas. A outra seqüência pode incluir uma região 3’ para o terminador do gene alvo, toda ou uma porção da região terminadora, e/ou toda ou uma porção da região codificante de gene alvo. Uma construção de supressão é então produzida contendo as duas seqüências orientadas na mesma direção em relação uma à outra como elas aparecem nativamente sobre o cromossoma da célula hospedeira. Tipicamente um marcador de seleção é clonado entre as seqüências para permitir seleção de transformantes, como descrito mais inteiramente abaixo. Esta construção é usada para transformar a célula hospedeira. Processos de transformação química (tal como baseados em cloreto de cálcio ou acetato de lítio) e/ou eletroporação podem ser usados.

Em transformantes bem sucedidos, um evento de recombinação homóloga no local do gene alvo resulta na interrupção ou a supressão do gene funcional. Todo ou uma porção do gene alvo nativo, seu promotor e/ou terminador é suprimido durante este evento de recombinação. Se a construção de supressão contém material genético entre as duas seqüências tomadas do local alvo (tal como um cassete marcador de seleção ou cassete de gene estrutural), este material genético é inserido no genoma de célula hospedeira no local do material suprimido. Análises por PCR ou análises Southern podem ser realizadas para confirmar que a desejada supressão ocorreu.

É usualmente desejável que a construção de supressão também possa incluir um cassete marcador de seleção funcional. Quando uma construção de supressão simples é usada, o cassete marcador reside sobre o vetor à jusante (isto é, na direção 3’) da seqüência 5’ a partir de local alvo e à montante (isto é, na direção 5’) da seqüência 3’a partir do local alvo. Transformantes bem sucedidos conterão o cassete marcador de seleção, que proporciona à célula transformada com sucesso alguma característica que provê uma base para seleção. Um “gene marcador de seleção” é um que codifica uma proteína necessária para a sobrevivência e/ou crescimento da célula transformada em um meio de cultura seletivo. Genes marcadores de seleção típicos codificam proteínas que (a) conferem resistência a antibióticos ou outras toxinas, (tais como, por exemplo, zeocina (gene de resistência a bleomicina ble de *Streptoalloteichus hiindustanus*), G418 (gene de resistência a canamicina de Tn903) ou higromicina (gene de resistência a antibiótico aminoglicosídeo de *E. coli*)), (b) deficiências auxotróficas de complemento da célula (como, por exemplo, deficiência de aminoácido leucina (gene LEU2 *K. marxianus*) ou deficiência de uracila (por exemplo, gene URA3 de *K. marxianus* ou *S. cerevisiae*)); (c) permitem a célula sintetizar nutrientes críticos indisponíveis de meios simples, ou (d) conferem habilidade para a célula crescer sobre uma particular fonte de carbono, (tal como um gene MEL5 de *S. cerevisiae*, que codifica a enzi-

ma alfa galactosidase (melibiase) e confere a habilidade para crescer sobre melibiose como a única fonte de carbono). Marcadores de seleção preferidos incluem o gene de resistência a zeocina, gene de resistência a G418, um gene MEL5 e gene de resistência a higromicina. Um outro marcador de seleção preferido é um cassete de gene L-lactato:ferricitocromo c

5 óxido redutase (CYB2), contanto que a célula hospedeira tanto nativamente careça de um tal gene como que seu gene(s) CYB2 nativo seja primeiro suprimido ou interrompido.

O cassete marcador de seleção ainda incluirá seqüências promotoras e terminadoras, ligadas operativamente ao gene marcador de seleção, e que são operáveis na célula hospedeira. Um tipo apropriado de promotor é pelo menos 50%, 70%, 90%, 95% ou 99%

10 idêntico a um promotor que é nativo para um gene de levedura. Um tipo mais apropriado de promotor é pelo menos 50%, 70%, 90%, 95% ou 99% idêntico a um promotor para um gene que é nativo para a célula hospedeira. Promotores particularmente úteis incluem promotores para genes piruvato descarboxilase (PDC1), fosfoglicerato cinase (PGK), xilose redutase ((XR), xilitol desidrogenase (XDH), L-(+)-lactato citocromo c óxido redutase (CYB2), fator de

15 alongação de tradução-1 (TEF-1) e fator de alongação de tradução-2 ((TEF-2), especialmente a partir dos respectivos genes da célula hospedeira. Um promotor especialmente útil inclui a porção funcional de um promotor para um gene nativo PDC1, PGK, TEF1, ou TEF2 para a célula hospedeira, ou uma seqüência que é pelo menos 80, 85, 90 ou 95% idêntica a um tal promotor PDC1, PGK, TEF1 ou TEF2.

Um tipo apropriado de terminador é pelo menos 50%, 70%, 90%, 95% ou 99% idêntico a um terminador para um gene que é nativo para um célula de levedura. O terminador pode ser pelo menos 50%, 70%, 90%, 95% ou 99% idêntico a um terminador para um gene que é nativo para a célula hospedeira. Terminadores particularmente úteis para genes piruvato descarboxilase (PDC1), xilose redutase (XR), xilitol desidrogenase (XDH), L-

25 lactato:ferricitocromo c óxido redutase (CYB2) ou isso-2-citocromo c (CYC), ou um terminador da família galactose de genes em levedura, particularmente o assim chamado terminador GQAL10. Um terminador especialmente preferido inclui uma porção funcional de um terminador para um gene GAL10 nativo para a célula hospedeira, ou uma seqüência que é pelo menos 80, 85, 90 ou 95% idêntica a um tal terminador.

A construção de supressão pode ser desenhada de modo que o cassete marcador de seleção possa tornar-se espontaneamente suprimido como um resultado de um subsequente evento de recombinação homóloga. Um meio conveniente de realizar isto é desenhar o vetor de modo que o cassete de gene estrutural seja flanqueado por seqüências de repetição direta. Seqüências de repetição direta são seqüências de ADN idênticas, nativas

35 ou não nativas para a célula hospedeira, e orientadas sobre a construção na mesma direção com relação umas às outras. As seqüências de repetição diretas são vantajosamente de cerca de 50-1500 pb em comprimento. Não é necessário que as seqüências de repetição

diretas codifiquem algo. Esta construção permite a ocorrência de um evento de recombinação homóloga. Este evento ocorre com alguma baixa frequência, resultando em células contendo uma supressão do gene marcador de seleção e uma das seqüências de repetição direta. Pode ser necessário desenvolver transformantes para vários ciclos sobre meios não-seletivos para permitir a espontânea recombinação homóloga ocorrer em algumas das células. Células nas quais o gene marcador de seleção tornou-se espontaneamente suprimido podem ser selecionadas ou peneiradas nas bases de sua perda da característica de seleção proporcionada pelo gene marcador de seleção.

A construção de supressão de gene alvo também pode conter um cassete de gene estrutural, novamente localizado à jusante da região flanqueante 5' e à montante da região flanqueante 3', mas preferivelmente não dentro de qualquer cassete marcador de seleção que possa estar presente. Uma tal construção permite a simultânea supressão do gene alvo e inserção de um gene estrutural. Por "gene estrutural", é pretendido qualquer gene que codifica uma proteína, outro que não o gene alvo ou um gene marcador de seleção como descrito acima. Uma ampla variedade de genes estruturais pode ser usada, mas aqueles de particular interesse para esta invenção são um gene que confere à célula a habilidade para produzir um ácido orgânico, ou um gene que confere à célula a habilidade de consumir uma particular fonte de carbono, tal como um açúcar pentose.

Em casos onde um marcador de seleção é usado, a transformação pode ser realizada com par de construções de supressão ao invés de uma única construção de supressão. Uma do par conterá a primeira seqüência a partir do local do gene alvo e uma parte não-funcional do cassete de gene marcador. A outra do par conterá a segunda seqüência a partir do local do gene alvo e uma outra parte não-funcional do cassete de gene marcador. As duas partes do cassete de gene marcador são selecionadas de modo que juntas elas formam um cassete completo. As extremidades de cada uma das duas partes do cassete de gene marcador compartilham uma seqüência comum, isto é, uma porção do cassete é duplicada nas extremidades de cada uma das duas partes. A célula é transformada simultaneamente com estes para realização de desejada supressão ou interrupção, com a formação de um cassete de gene estrutural ou marcador funcional, completo. Uma proporção das células integrará homogeneamente ambas construções de supressão no local alvo, e serão presas ainda em um evento de recombinação homóloga para reconstituição de um cassete de gene de seleção funcional a partir de dois fragmentos não-funcionais. Transformantes bem sucedidos podem ser selecionados nas bases da característica proporcionada pelo marcador de seleção.

Quando o caminho metabólico nativo da célula inclui o caminho diidrox acetona fosfato para glicerol-3-fosfato para glicerol (via enzimas GDP e GPP), tanto o gene(s) GDP como gene(s) GPP pode ser suprimido ou interrompido. Ambos genes GDP e GPP podem

ser suprimidos. Em tal caso, a supressão ou interrupção de ambos genes GDP e GPP pode ser feita simultânea ou seqüencialmente em qualquer ordem. Se a célula contem múltiplos genes GDP ou GPP, ou múltiplos alelos de tais genes, é preferido suprimir todos aqueles que são funcionais na célula. Em casos onde o caminho metabólico nativo de célula inclui o

5 caminho diidroxi acetona fosfato para diidroxi acetona para glicerol (via diidroxi acetona fosfato fosfatase e glicerol desidrogenase), tanto o gene diidroxi acetona fosfato fosfatase como glicerol desidrogenase pode ser suprimido ou interrompido. Ambos genes diidroxi acetona fosfato fosfatase ou glicerol desidrogenase podem ser suprimidos ou interrompidos, o que pode ser feito simultânea ou seqüencialmente, em cujo caso isto pode ser feito em qualquer

10 ordem. Como antes, múltiplas cópias funcionais ou alelos de tais genes são preferivelmente todas suprimidas.

Em certos aspectos da invenção, a célula é capaz de produzir um desejado ácido orgânico (ou seu sal). Esta capacidade é manifestada através de uma habilidade para converter pelo menos 5%, tal como pelo menos 10%, pelo menos 50%, pelo menos 70%, pelo

15 menos 80% ou pelo menos 90%, em peso de uma fonte de carbono ao desejado ácido orgânico quando cultivada sob pelo menos um conjunto de condições de fermentação. Na medida em que poucas células de levedura têm a habilidade nativa para produzir tais ácidos, a célula da invenção na maioria dos casos conterà pelo menos um gene exógeno, funcional, que permite à mesma produzir o ácido.

20 Células de particular interesse produzem lactato, pelo que é pretendido ácido láctico ou um seu sal. Em tal caso, a célula da invenção contem pelo menos um gene lactato desidrogenase (LDH) exógeno funcional integrado em seu genoma. Um gene LDH é um que codifica uma enzima lactato desidrogenase funcional. Uma enzima LDH funcional é uma que catalisa a redução de piruvato a lactato. Genes LDH são específicos para a produção de L-

25 LDH ou D-LDH, que respectivamente permite a célula produzir o enantiômero L- ou D-ácido láctico (ou seus sais). É possível que a célula modificada da invenção contenha ambos genes L- e D-LDH, e assim seja capaz de produzir ambos enantiômeros de ácido láctico. Entretanto, é preferido que somente genes L- ou somente D-LDH estejam presentes, de modo que a célula produza um produto ácido láctico mais opticamente puro.

30 Apropriados genes LDH incluem aqueles obtidos de fontes bacterianas, fungos, levedura ou mamífero. Exemplos de específicos genes L-LDH são aqueles obtidos de *L. helveticus*, *L. casei*, *B. megaterium*, *P. acidilactici* e fontes bovinas. Exemplos de específicos genes D-LDH são aqueles obtidos de *L. helveticus*, *L. johnsonii*, *L. bulgaricus*, *L. delbrueckii*, *L. plantarum*, e *L. pentosus*. Genes funcionais que são idênticos ou pelo menos 80% idênticos a quaisquer destes genes L-LDH ou D-LDH são apropriados. Os genes nativos obtidos

35 a partir de qualquer uma destas fontes podem ser submetidos a mutagênese se necessário para prover uma seqüência codificante partindo com o usual códon de partida eucariótico

(ATG), ou para outros propósitos. Um gene L-LDH preferido é aquele obtido de *L. helveticus* ou um que é pelo menos 80%, 85%, 90% ou 95% idêntico a tal gene. Um outro gene L-LDH preferido é aquele obtido de *B. megaterium* ou um que é pelo menos 80%, 85%, 90% ou 95% idêntico a tal gene. Um gene D-LDH preferido é aquele obtido de *L. helveticus* ou um
 5 que é pelo menos 80%, 85%, 90% ou 95% idêntico a tal gene.

Genes LDH particularmente apropriados incluem aqueles que codificam uma enzima com uma seqüência de aminoácidos que é pelo menos 60%, especialmente pelo menos 80%, 85% ou 95%, idêntica a SEQ ID NO: 45 de WO 03/049525 ou comparada com SEQ ID NO: 49 de WO 03/049525. Genes LDH particularmente apropriados também incluem aque-
 10 les que codificam uma enzima tendo uma seqüência de proteína que é pelo menos 60%, 80%, 85% ou 95% idêntica a SEQ ID NO: 46 ou 50 de WO 03/049525.

A célula transformada pode conter um gene LDH simples ou múltiplos genes LDH, tal como de 1 a 10 genes LDH, especialmente de 1 a 5 genes LDH. Quando a célula transformada contém múltiplos genes LDH, os genes individuais podem ser cópias do mesmo
 15 gene, ou incluem cópias de dois ou mais diferentes genes LDH. Múltiplas cópias do gene LDH exógeno podem ser integradas em um locus simples (assim são adjacentes umas às outras), ou em vários loci dentro do genoma de célula hospedeira.

O gene LDH exógeno está sob controle transcricional de um ou mais promotores e um ou mais terminadores, ambos os quais são funcionais na célula de levedura modificada. Apropriados promotores e terminadores são como descritos antes com relação ao cassete de gene marcador de seleção, e também são descritos em WO 99/14335, WO 00/71738, WO 02/42471, WO 03/102201, WO 03/102152 e WO 03/049525. Um promotor especialmen-
 20 te útil inclui a porção funcional de um promotor para um gene PDC1, PGK, TEF1 ou TEF2 da célula hospedeira ou é pelo menos 80%, 85%, 90% ou 95% idêntico a um tal promotor. Um terminador especialmente preferido inclui uma porção funcional de um terminador para um gene PDC1 da célula hospedeira ou é pelo menos 80%, 85%, 90%, ou 95% idêntico ao
 25 mesmo.

Quando múltiplos genes LDHexógenos são introduzidos na célula hospedeira, é possível para os diferentes genes LDH estarem sob o controle de diferentes tipos de promo-
 30 tores e/ou terminadores.

O gene LDH exógeno pode ser integrado randomicamente no genoma da célula hospedeira ou inserido em uma ou mais localizações alvejadas. Exemplos de localizações alvejadas incluem o locus de um gene que é desejavelmente suprimido ou interrompido, tal como aquele de um gene PDC1, um gene glicerol-3-fosfato desidrogenase, um gene glice-
 35 rol-3-fosfatase, um gene diidroxi acetona fosfato fosfatase ou um gene glicerol desidrogenase. O cassete de gene LDH exógeno pode residir sobre uma construção para a supressão ou interrupção de um gene glicerol-3-fosfato desidrogenase, glicerol-3-fosfatase, diidroxi

acetona fosfato fosfatase ou glicerol desidrogenase, e desta maneira ser inserido no locus de um tal gene simultaneamente com a supressão ou interrupção do mesmo.

Processos para transformação de uma célula de levedura para introdução de um cassete de 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. Tais processos são aplicáveis a esta invenção.

A célula também pode ser modificada para permitir que a mesma produza um ou mais outros ácidos orgânicos. Por exemplo, a célula pode ser transformada com um cassete de gene exógeno que codifica uma enzima beta alanina / piruvato amino transferase funcional, assim permitindo a célula produzir ácido 3-hidroxi propiônico. Processos para realização disto são descritos em WO 2005/118719.

A célula de levedura geneticamente modificada da invenção pode incluir adicionais modificações genéticas que proporcionam um ou mais atributos desejados às células.

Uma modificação adicional de particular interesse em algumas realizações inclui uma supressão ou interrupção de gene(s) piruvato descarboxilase. Isto reduz a habilidade de célula produzir etanol, o que é particularmente desejável em casos nos quais um ácido orgânico tal como lactato é o produto desejado. Se a célula hospedeira contém múltiplos genes PDC, é especialmente preferido suprimir ou interromper todos os genes PDC, embora seja possível suprimir menos que todos tais genes PDC. Supressão de PDC pode ser realizada usando-se processos análogos àqueles descritos em WO 99/14335, WO 02/42471, WO 03/049525, WO 03/102152 e WO 03/102201. Supressão de PDC também pode ser realizada com simultânea inserção de um cassete de gene LDH ou outro cassete de gene marcador de seleção ou estrutural. Em um processo de particular interesse, (1) seqüências não-contíguas a partir do locus do gene(s) PDC são clonadas, (2) uma construção contendo as seqüências não-contíguas é produzida, e (3) a célula hospedeira é transformada com a construção. Um evento recombinante homólogo resulta em uma supressão ou interrupção do gene PDC funcional em uma porção dos transformantes. Isto pode ser repetido se necessário para suprimir ou interromper múltiplos genes PDC ou alelos. Em algumas espécies de levedura, como *I. orientalis*, genes PDC múltiplos ou alelos existem que são homólogos de perto. Foi verificado que em pelo menos alguns exemplos seqüências não-contíguas tomadas do locus de gene ou alelo podem ser usadas na construção para suprimir ou interromper ambos genes PDC ou alelos. A construção usada para interromper o gene(s) PDC pode incluir um ou mais cassetes de gene estrutural ou marcador funcionais inseridos à jusante da porção flanqueante 5' do gene PDC nativo e à montante das porções flanqueantes 3' do gene PDC nativo. Esta abordagem permite a supressão do gene PDC e inserção do cassete de gene funcional em uma etapa de transformação simples.

Uma outra modificação adicional de particular interesse é uma (ou mais) que indivi-

dual ou coletivamente confere à célula a habilidade para fermentar açúcares pentose para desejáveis produtos de fermentação. Entre o último tipo de modificações estão (1) inserção de um gene xilose isomerase funcional, (2) uma supressão ou interrupção de um gene nativo que produz uma enzima que catalisa a conversão de xilose a xilitol, (3) uma supressão ou interrupção de um gene xilitol desidrogenase funcional e/ou (4) modificações que fazem a célula superexpressar uma xilulo cinase funcional. Processos para introdução daquelas modificações em células de levedura são descritos, por exemplo, em WO 04/099381, aqui incorporado por referência. Processos apropriados para inserção de um gene xilose isomerase funcional, supressão ou interrupção de um gene nativo que produz uma enzima que catalisa a conversão de xilose a xilitol, supressão ou interrupção de um gene xilitol desidrogenase funcional modificando a célula para superexpressão de uma xilulo cinase funcional são descritos, por exemplo, em WO 04/099381, aqui incorporado por referência.

Uma outra modificação adicional de particular interesse em células produzindo lactato da invenção inclui uma supressão ou interrupção de pelo menos um gene L- ou D-lactato:ferricitocromo c óxido redutase.

Em geral, a célula da invenção é caracterizada por uma habilidade reduzida para sintetizar glicerol. Um processo útil para avaliação de uma habilidade de célula para sintetizar glicerol é através de cultura da célula sob as condições micro-aeróbicas padrões descritas anteriormente. Um meio de fermentação definido é usado, que contem no início de cultura 5 g/L de sulfato de amônio, 3 g/L de dihidrogeno fosfato de potássio, 0,5 g/L de sulfato de magnésio, elementos em traços, vitaminas e 150 g/L de glicose. O pH é ajustado para 3,5 no início de cultura. O pH é permitido variar livremente durante a cultura, exceto que o meio é tamponado se necessário para evitar que o pH caia abaixo de 3,0 ou eleve-se acima de 7,0 durante a cultura. O meio de fermentação é inoculado com células de levedura suficientes que são o objeto da avaliação para produzir uma OD₆₀₀ de 1.0. A temperatura de cultura é de 30°C. A cultura é continuada até a concentração de glicose ser reduzida para 5 g/L, mas não é continuada por mais que 120 horas. Durante a cultura, condições de aeração e agitação são selecionadas para produzirem uma taxa de tomada de oxigênio de $5,0 \pm 1,0$ mmol/L/h. Sob estas condições padrões, células da invenção tipicamente produzem não mais que 2,0 g/L de glicerol. Mais tipicamente, elas produzem não mais que 0,6 g/L de glicerol sob estas condições e na maioria dos casos produzem não mais que 0,2 g/L de glicerol sob estas condições. Células preferidas também produzem, sob estas condições micro-aeróbicas padrões, pelo menos 10 g/L de pelo menos um produto de fermentação desejável, tal como etanol, ou um ácido orgânico como lactato. As células mais preferivelmente produzem pelo menos 40 e especialmente pelo menos 50 g/L do desejado produto de fermentação sob estas condições.

A célula da invenção pode ser cultivada, sob as condições micro-aeróbicas padrões

descritas anteriormente ou qualquer outro conjunto útil de condições de fermentação, para produzir um ou mais desejáveis produtos de fermentação. Etanol é um exemplo de um produto de fermentação que muitas espécies de leveduras produzem naturalmente. Como discutido anteriormente, as células podem ser modificadas para permitir que as mesmas produzam outros produtos de fermentação desejáveis, incluindo ácidos orgânicos como lactato ou ácido 3-hidroxi propiônico. As células podem ser modificadas para produzirem também outros produtos de fermentação, incluindo outros ácidos ou outros produtos que não são ácidos.

No processo de fermentação da invenção, a célula da invenção é cultivada em um meio de fermentação que inclui uma fonte de carbono que é fermentável pela célula transformada. A fonte de carbono pode ser um açúcar hexose tal como glicose, ou um oligômero ou outro polímero de glicose tal como glicano, maltose, maltotriose ou isomaltotriose. A fonte de carbono pode ser um outro açúcar hexose, do qual panose, frutose e seus respectivos oligômeros e polímeros são exemplos. Se a célula nativamente tem ou é modificada para proporcionar uma habilidade para fermentar açúcares pentose, a fonte de carbono pode incluir um açúcar pentose tal como xilose, ou um oligômero ou polímero de xilose como xilano. Tais açúcares pentose são apropriadamente hidrolisados de uma biomassa contendo hemicelulose. Em caso de açúcares oligoméricos, pode ser necessário adicionar enzimas ao caldo de fermentação de modo a digerir estes ao correspondente açúcar monomérico para fermentação pela célula.

O meio tipicamente conterá nutrientes como requeridos pela particular célula, incluindo uma fonte de nitrogênio (como aminoácidos, proteínas, fontes de nitrogênio inorgânicas como amônia ou sais de amônio, e semelhantes), e várias vitaminas, minerais e semelhantes. Um assim chamado meio "complexo" ou um assim chamado meio "definido" pode ser usado.

Outras condições de fermentação, como temperatura, densidade de célula, seleção de substrato(s), seleção de nutrientes, e semelhantes não são consideradas serem críticas para a invenção e são genericamente selecionadas para provimento de um processo econômico. Temperaturas durante cada uma da fase de crescimento e a fase de produção pode variar de acima de temperatura de congelamento do meio a cerca de 50°C, embora isto dependa em alguma extensão da habilidade da linhagem tolerar temperaturas elevadas. Uma temperatura preferida, particularmente durante a fase de produção, é de cerca de 30-45°C.

Durante a fase de produção, a concentração de células no meio de fermentação está tipicamente na faixa de 0,1 a 20, preferivelmente de 0,1 a 5, mesmo mais preferivelmente de 1 a 3 g de células secas / litro de meio de fermentação. A fermentação pode ser conduzida aerobicamente, micro-aerobicamente, ou anaerobicamente. Se desejado, taxa de tomada de oxigênio pode ser usada como um controle de processo, como descrito em WO

03/102200. Células da invenção podem desempenhar especialmente bem quando cultivadas sob condições micro-aeróbicas caracterizadas por uma taxa de tomada de oxigênio de 4 a 12, especialmente de 5 a 10, mmoles/L/h.

Em casos preferidos nos quais a célula produz um ácido orgânico tal como lactato, o meio pode ser tamponado durante a fase de produção da fermentação de modo que o pH seja mantido em uma faixa de cerca de 3,5 a cerca de 9,0, ou de cerca de 4,5 a cerca de 7,0. Apropriados agentes tamponantes são materiais básicos que neutralizam o ácido na medida em que ele é formado, e incluem, por exemplo, hidróxido 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 semelhantes. Em geral, aqueles agentes tamponantes que têm sido usados em processos de fermentação convencionais também são apropriados aqui.

Em uma fermentação tamponada, produtos de fermentação ácidos são neutralizados ao correspondente sal quando eles são formados. Recuperação do ácido por isso envolve regeneração do ácido livre. Isto é tipicamente feito através de remoção de células e acidulação de caldo de fermentação com um ácido forte tal como ácido sulfúrico. Um subproduto sal é formado (gypsum no caso onde um sal de cálcio é o agente neutralizante e ácido sulfúrico é o agente acidulante), que é separado do caldo. O ácido é então recuperado do caldo através de técnicas tais como extração líquido – líquido, destilação, absorção, etc., como são descritas em T. B. Vickroy, Vol. 3, Chapter 38 of *Comprehensive Biotechnology*, (ed. M. Miao-Young), Pergamon, Oxford, 1985; R. Datta, et al., *FEMS Microbiol. Rev.*, 1995, 16:221-231; patentes U.S. Nos. 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.

Alternativamente, o pH do meio de fermentação pode ser deixado cair durante a cultura a partir de um pH de partida que está acima de pKa do ácido produto, tipicamente 5,5 ou maior, para ou abaixo de pKa do produto de fermentação ácido, tal como na faixa de cerca de 1,5 a cerca de 3,5, na faixa de cerca de 1,5 a cerca de 3,0, ou na faixa de cerca de 1,5 a cerca de 2,5.

Também é possível conduzir-se a fermentação para produzir um produto ácido através de ajuste de pH do caldo de fermentação para ou abaixo de pKa do ácido produto antes de ou no início do processo de fermentação. O pH a seguir pode ser mantido no ou abaixo do pKa do ácido produto por toda cultura, ou pode ser deixado aumentar acima de pKa do ácido quando a fermentação procede. No caso anterior, o pH é preferivelmente mantido dentro de faixa de cerca de 1,5 a cerca de 3,5, na faixa de cerca de 1,5 a cerca de 3,2, ou na faixa de cerca de 2,0 a cerca de 3,0.

A célula da invenção tem uma habilidade agudamente reduzida de produzir glicerol sob muitas condições de fermentação. A reduzida habilidade da célula de produzir glicerol é

manifestada por baixos rendimentos de glicerol. As células da invenção tipicamente metabolizam menos que 2% em peso da fonte de carbono que é consumida a glicerol. Na maioria dos casos, o rendimento de glicerol é menos que 1% ou mesmo menos que 0,1%, baseado no peso de fonte de carbono que é consumido na cultura. Preferivelmente, a célula metaboliza pelo menos 40%, tal como pelo menos 50, 60, 70, 80 ou 85%, da fonte de carbono que é consumida para o desejado produto de fermentação.

Foi verificado que as células da invenção exibem boa habilidade para crescimento sob condições de fermentação. Isto é surpreendente, devido aos vários usos da célula para glicerol e o papel de glicerol ser acreditado desempenhar no balanço de NADFH/NAD⁺ em células de levedura tipo selvagem. Está dentro do escopo da invenção adicionar glicerol ao meio de fermentação para compensar a diminuída capacidade de célula produzir glicerol por si própria. Entretanto, os requerentes verificaram que assim fazendo rende pequeno benefício, pelo menos em alguns processos de fermentação.

Os exemplos que se seguem são providos para ilustrarem a invenção, mas não são pretendidos limitarem seu escopo. Todas as partes e porcentagens são em peso a menos que de outro modo indicado.

Exemplo 1A: Mutagênese de *K. marxianus* linhagem CD607 e seleção de linhagem mutante (CD853) tendo resistência a ácido glicólico

K. marxianus linhagem CD607 é descrita no exemplo 3D de WO 03/102152. Esta linhagem tem uma supressão de seu gene piruvato descarboxilase e uma inserção de um gene lactato desidrogenase exógeno naquele locus. Células de linhagem CD607 são submetidas a mutagênese via exposição a luz ultravioleta.

Células de uma placa de YP fresco (extrato de levedura plus peptona) + 20 g/L glicose são re-suspensas em 2 mL de peptona levedura + 50 g/L glicose para uma OD₆₀₀ aproximada de 6. Dez alíquotas de 125 µL desta suspensão de células são pipetadas em dez cavidades de uma placa de micro – titulação de 96 cavidades de 300 µL. A placa de micro – titulação é exposta a 12500 µJoule/cm² de luz UV para matar 90-99% das células. A placa de micro – titulação é então incubada no escuro por toda noite a 30°C com agitação (225 rpm) para permitir que as células se recuperem antes de revestimento sobre placas de seleção.

100 µL das suspensões de células tratadas com UV são então revestidos sobre uma placa de agar de dextrose de batata (PDA) + 15 g/L de ácido glicólico para selecionar linhagens resistentes a ácido glicólico. Estas placas são incubadas a 30°C por vários dias até aparecimento de colônias. Uma colônia simples é isolada para ainda análises.

Aproximadamente 2×10^8 células mutagenizadas são revestidas sobre placas PDA contendo 15 g/L de ácido glicólico e incubadas a 30°C. Colônias que crescem sobre estas placas são desenvolvidas por toda noite em frascos de agitação defletidos a 30°C e 225

rpm, de agitação em YP (peptona levedura) + 100 g/L glicose sem tampão. Frascos de produção são então inoculados com 2 g/L de peso seco de células a partir destes frascos de agitação. Os frascos de produção são cultivados a 30°C e 70 rpm de agitação em YP + 50 g/L de glicose. Amostras são periodicamente retiradas para medição de glicose, lactato, e-
5 tanol e piruvato por HPLC usando processos tais como descrito no Exemplo 1M de WO 03/102201. Uma linhagem que produz cerca de 26 g/L de lactato após 88 horas é designada como linhagem CD635. Linhagem CD635 é capaz de crescer sobre lactato como a única fonte de carbono.

Células de linhagem CD635 são submetidas a uma adicional etapa de mutagênese
10 como descrito acima. As resultantes células mutagenizadas são selecionadas para colônias que são capazes de crescerem sobre PDA contendo 25 g/L de ácido glicólico. Colônias que são resistentes a ácido glicólico são desenvolvidas separadamente por toda noite em YP + 100 g/L de glicose em frascos de agitação a 30°C e 250 rpm de agitação. Biomassa é coletada por centrifugação e 2 g/L em peso de células secas são inoculados em 50 mL de YP +
15 50 g/L de glicose em um frasco de agitação defletido. Os frascos são cultivados a 30°C e 250 rpm de agitação por aproximadamente 92 horas. Um mutante que produz títulos finais significativamente maiores de lactato, comparado a linhagens parentes CD607 e CD635, é designado como linhagem CD853.

Linhagem CD853 é incapaz de crescer sobre lactato como a única fonte de carbono, sugerindo que o gene L-lactato:ferricitocromo c óxido redutase (KmCYB2) tornou-se
20 não-funcional neste mutante. Por isso, a região codificando KmCYB2 plus ~500 pb e à jusante da região codificante KmCYB2 é amplificada a partir desta linhagem, usando PCR com enzima FailSafe de alta fidelidade e ADN genômico como o molde. O resultante produto de PCR de ~2,75 kbp é purificado via purificação em coluna Qiagen e seqüenciado sobre
25 a inteira região codificante KmCYB2. Linhagem CD853 é verificada ter uma inserção de quatro bases em posição de aminoácido 62 do gene KmCYB2, que causa uma mutação de desvio de quadro, resultando em um códon de interrupção na posição de aminoácido 76 e truncando a proteína.

Exemplo 1B: Construção de vetores de supressão GPD1F pBH158 (Fig. 1) e p-
30 BH159 (Fig. 2)

Um plasmídeo designado pVR29 (descrito no Exemplo 1C e Figura 4 de WO 03/102152) contem o gene de resistência canamicina de Tn903 (gene G418) sob o controle de um promotor piruvato descarboxilase e um terminador GAL10. Plasmídeo pVR29 é digerido com MluI e PstI e um fragmento de 5,1 kbp contendo o cassete de gene G418 assim
35 obtido é purificado em gel e desfosforilado. Uma região de 1,2 kbp de ADN à montante do gene GPD de *K. marxianus* (KmGPD1F) é amplificada por PCR usando iniciadores identificados como SEQ ID NO. 14 e SEQ ID NO. 15, com ADN genômico de *K. marxianus* como

um molde. O produto de PCR é purificado em gel, digerido com *MluI* e *PstI*, e ligado ao fragmento de 5,1 kbp de plasmídeo pVR29 para produzir um plasmídeo designado como pBH158 (Fig. 1). Plasmídeo pBH158 contém, em ordem de transcrição, o flanco à montante de 1,2 kbp do gene *KmGPD1F* e o cassete de expressão G418.

5 Para o segundo vetor de supressão, plasmídeo pVR29 é digerido com *NgoMIV* e *AatII* e um fragmento de 4,7 kbp contendo o cassete de expressão G418 é purificado em gel e desfosforilado. Uma região de 0,7 kbp de ADN à jusante do gene *KmGPD1F* é amplificada por PCR usando iniciadores identificados como SEQ ID NO. 16 e SEQ ID NO. 17, novamente usando ADN genômico de *K. marxianus* como um molde. O produto de PCR é purificado
10 com gel, digerido com *NgoMIV* e *AatII*, e ligado ao fragmento de 4,7 kbp de pVR29 para produzir um plasmídeo designado como pBH159 (Fig. 2). Plasmídeo pBH159 contém, em ordem de transcrição, o cassete de expressão G418 e o flanco à jusante de 0,7 kbp do gene *KmGPD1F*.

Exemplo 1C: Transformação de linhagem CD853 (Ex. 1A) com plasmídeos pBH158 e
15 pBH159 (Ex. 1B, Figs. 1 e 2) para produzir um transformante (linhagem CD1606) tendo um gene LDH exógeno, uma supressão de um gene PDC nativo, um gene CYB2 nativo interrompido e um gene *GPD1F* nativo suprimido

Plasmídeo pBH158 é digerido com *MluI* e *HindIII*. Estas enzimas de restrição cortam o plasmídeo para produção de um fragmento de 2,6 kbp que contém o flanco à montante de 1,2 kbp do gene *KmGPD1F* e parte do cassete de expressão G418. Este fragmento é
20 isolado a partir de um gel agarose. Plasmídeo pBH159 é digerido com *XhoI* e *NgoMIV*. Estas enzimas de restrição cortam o plasmídeo para produção de um fragmento de 2,0 kbp que contém uma porção do cassete de expressão G418 e o flanco à jusante de 0,7 kbp do gene *KmGPD1F*. Este fragmento é isolado a partir de um gel agarose. Os dois fragmentos
25 isolados juntos contêm o inteiro cassete de expressão G418 com alguma duplicação nas extremidades dos fragmentos.

Linhagem CD853 é crescida por toda noite em YP + 60 g/L de glicose + MES 0,2 M + etanol 1%, pH 6,5, e é eletroporada simultaneamente com o fragmento de 2,6 kbp de plasmídeo pBH158 e o fragmento de 2,0 kbp de pBH159. Transformantes são selecionados
30 sobre placas de YP + 20 g/L de glicose + 300 µg/mL de G418 a 30°C seguindo 2 dias de crescimento. 15 transformantes são colhidos, novamente feitos listras para placas de YP + 20 g/L de glicose + G418 e crescidos por toda noite. Somente células que foram co-transformadas com ambos fragmentos e nas quais ambos fragmentos tornaram-se homologicamente integrados no locus *KmGPD1F* serão resistentes a G418.

35 Supressão do gene *KmGPD1F* é verificada por PCR usando iniciadores identificados como SEQ ID NO. 18 e SEQ ID NO. 19. Sete transformantes exibem uma banda simples de 3,4 kbp através de PCR, indicando que o gene *KmGPD1F* é suprimido naqueles

transformantes. Um destes transformantes é designado como linhagem CD1606.

Exemplo 2A: Construção de vetores de supressão de gene GPP pBH160 (Fig. 3) e pBH161 (Fig. 4).

Plasmídeo pVR29 é digerido com MluI e KpnI e um fragmento de 5,1 kbp contendo o cassete de gene G418 assim obtido é purificado com gel e desfosforilado. Uma região de 0,9 kbp de ADN imediatamente à montante do gene GPP nativo (gene KmHOR2) é amplificada por PCR usando iniciadores identificados como SEQ ID NO. 20 e SEQ ID NO. 21, usando ADN genômico de *K. marxianus* como o molde. O produto de PCR é purificado com gel, digerido com MluI e KpnI, e ligado ao fragmento de 5,1 kbp de plasmídeo pVR29 para produzir um plasmídeo designado como pBH160 (Fig. 3). Plasmídeo pBH160 contém, em ordem de transcrição, o flanco à montante de 0,9 kbp do gene KmHOR2 e o cassete de expressão de G418.

Plasmídeo pVR29 é digerido com NgoMIV e SpeI e um fragmento de 4,7 kbp contendo o cassete de expressão G418 é purificado em gel e desfosforilado. Uma região de 0,8 kbp de ADN imediatamente à jusante do gene KmHOR2 é amplificada por PCR usando iniciadores identificados como SEQ ID NO: 22 e SEQ ID NO: 23, usando ADN genômico de *K. marxianus* como o molde. O produto de PCR é purificado com gel, digerido com NgoMIV e SpeI, e ligado ao fragmento de 4,7 kbp de pVR29 para produzir um plasmídeo designado como pBH161 (Fig. 4). Plasmídeo pBH161 contém, em ordem de transcrição, o cassete de expressão G418 e o flanco à jusante de 0,8 kbp do gene KmHOR2.

Exemplo 2B: Transformação de linhagem CD853 (Ex. 1A) com plasmídeos pBH160 e pBH161 (Ex. 2A, Figs. 3 e 4) para produzir um transformante (linhagem CD1608) tendo um gene LDH exógeno, uma supressão de um gene PDC nativo, um gene CYB2 nativo interrompido e um gene GPP nativo suprimido.

Plasmídeo pBH160 é digerido com MluI e HindIII. Estas enzimas de restrição cortam o plasmídeo para produção de um fragmento de 2,3 kbp que contém o flanco à montante de 0,9 kbp do gene GPP de *K. marxianus* ((KmHOR2) e parte do cassete de expressão G418. Este fragmento é isolado a partir de um gel agarose. Plasmídeo pBH161 é digerido com XhoI e NgoMIV. Estas enzimas de restrição cortam o plasmídeo para produção de um fragmento de 2,0 kbp que contém o flanco à montante de 0,8 kbp do gene KmHOR2 e parte do cassete de expressão G418. Este fragmento é isolado de um gel agarose. Os dois fragmentos isolados contêm juntos o inteiro cassete de expressão G418 com alguma duplicação nas extremidades dos fragmentos.

Linhagem CD853 é crescida por toda noite em YP + 60 g/L de glicose + MES 0,2 M + etanol 1%, pH 6,5, e é então eletroporada com ambos, o fragmento de 2,3 kbp de plasmídeo pBH160 e o fragmento de 2,0 kbp de plasmídeo pBH161. Transformantes são selecionados sobre placas de YP + 20 g/L glicose + 300 µg/mL G418 a 30°C seguindo 2 dias de

crescimento. 15 transformantes são feitos novamente listras para placas de YP + 20 g/L glicose + 300 µg/mL G418 e crescidos por toda noite. Todos os transformantes crescem sobre este meio. Somente células que foram co-transformadas com ambos fragmentos e nas quais ambos fragmentos tornaram-se homologamente integrados no locus KmHOR2
5 serão resistentes a G418.

Supressão do gene KmHOR2 é verificada por PCR usando iniciadores identificados como SEQ ID NO. 20 e SEQ ID NO. 21. Três transformantes renderam uma banda de 3,8 kbp simples que é indicativa da supressão do gene KmHOR2. Um destes transformantes é designado linhagem CD1608.

10 Exemplo 3: Cultivo de cultura em batelada micro – aeróbica de linhagens CD853 (Ex. 1A), CD1606 (Ex. 1C) e CD1608 (Ex. 2B).

Linhagens CD853, CD1606 e CD1608 são separadamente cultivadas sob condições micro – aeróbicas. Fermentações em duplicata são realizadas nos casos de linhagens CD1606 e CD1608. Em cada caso, um reator de cultura de batelada de estágio simples é
15 usado. O meio de fermentação é um meio definido que inclui sulfato de amônio, diidrogeno fosfato de potássio, e sulfato de magnésio, elementos em traços, vitaminas, agente antiespumante, e cerca de 90 g/L de glicose. O pH do meio é ajustado para cerca de 3,0 através de adição de hidróxido de potássio. O meio é ajustado para 30°C e inoculado com 1 mL de células. As células são cultivadas a 30°C sob condições de agitação e aeração que condu-
20 zem a uma taxa de tomada de oxigênio de 5-6 mmoles/L/h. Taxa de tomada de oxigênio é determinada de acordo com os processos descritos em WO 03/102200.

Amostras do caldo de fermentação são periodicamente removidas e ensaiadas para lactato, acetato, glicerol e piruvato. Produção de dióxido de carbono é medida através de determinação de teor de dióxido de carbono de gases ventilados do reator.

25 Linhagem CD853 (não um exemplo da invenção) produz lactato em uma taxa de 0,85 g/L-h através de estágios iniciais da fermentação, até o título de lactato ser aproximadamente 20 g/L. Rendimento de lactato através deste ponto é cerca de 70%. Após este, produção de lactato diminui para cerca de 0,76 g/L-h e rendimento de lactato cai levemente. Produção para esta linhagem é interrompida após 86 horas, em cujo tempo o caldo de fer-
30 mentação contém g/L de glucose. Título de lactato é 59 g/L. Taxa de produção de lactato total é 0,65 g/L-h, e rendimento total de lactato é 70%. Rendimentos para piruvato, acetato, glicerol e dióxido de carbono para linhagem CD853 são 0,6%, 0%, 5,1% e 14%, respectivamente. Rendimento para biomassa é de 6,4%.

Linhagem CD1606 produz lactato em uma taxa de 0,77-0,84 g/L-h através de está-
35 gios iniciais da fermentação, até o título de lactato ser aproximadamente 20 g/L. Rendimento de lactato através daquele ponto é cerca de 72-80%. Após isto, produção de lactato diminui para cerca de 0,39-0,41 g/L-h e rendimento de lactato cai levemente. Produção para esta

linhagem é interrompida após 137 horas, em cujo momento o caldo de fermentação contém 14-19 g/L de glicose. Título de lactato é 43-45 g/L. Taxa de produção de lactato total é 0,32-0,34 g/L-h, e rendimento total para lactato é de 60-63%. Rendimentos para piruvato, acetato, glicerol e dióxido de carbono para linhagem CD1606 são 0,1%, 0,5%, 0% e 26-29%, respectivamente. Rendimento para biomassa é de 7,9%. Estes resultados mostram que supressão do gene KmGPD1F nativo é efetiva para interromper a capacidade de célula produzir glicerol. Surpreendentemente, a supressão deste gene (e a resultante falta de produção de glicerol) tem pequeno ou nenhum efeito sobre crescimento de célula.

Linhagem CD1608 produz lactato em uma taxa de 0,66 g/L-h através de estágios iniciais da fermentação, até o título de lactato ser aproximadamente 20 g/L. Rendimento de lactato através deste ponto é cerca de 70-75%. Após isto, produção de lactato diminui para cerca de 0,37 g/L-h e rendimento de lactato cai levemente. Produção para esta linhagem é interrompida após 137 horas, em cujo momento o caldo de fermentação contém 19 g/L de glicose. Título de lactato é de 42 g/L. Taxa de produção total de lactato é de 0,31 g/L-h, e rendimento total para lactato é 59-60%. Rendimentos para piruvato, acetato, glicerol e dióxido de carbono para linhagem CD1608 são 0,0-0,1%, 0,8%, 0% e 26-28%, respectivamente. Rendimento para biomassa é 7,9-8,2%. Estes resultados mostram que supressão do gene KmHOR2 nativo também é efetiva para interromper a capacidade de célula produzir glicerol. Novamente, a supressão deste gene (e a resultante falta de produção de glicerol) não tem efeito sobre crescimento de célula.

Exemplo 4A: Clonagem de gene GPD1 nativo de *L. orientalis* junto com região flanqueante à montante e à jusante

Genes glicerol-3-fosfato desidrogenase conhecidos de várias espécies de leveduras (*S. cerevisiae*, *K. Marxianus*, *Y. lipolytica*, *P. jadinii*, *D. hansenii* e *C. glabrata*) são alinhados e regiões que são altamente conservadas entre os vários genes são identificadas. Dois conjuntos de iniciadores degenerados foram desenhados nestas regiões de alta homologia. Estes conjuntos são identificados como SEQ ID NO. 24 e SEQ ID NO. 25, e SEQ ID NO. 26 e SEQ ID NO. 27, respectivamente. PCR é realizada usando o primeiro conjunto de iniciadores e ADN genômico de *L. orientalis* como o molde, e um produto de ~200 pb é obtido como esperado. PCR é novamente realizada usando o segundo conjunto de iniciadores e ADN genômico de *L. orientalis* como o molde, e um produto de ~400 pb é obtido como esperado. Os dois produtos de PCR são purificados com gel e seqüenciados usando os mesmos iniciadores. Usando a seqüência parcial assim obtida, iniciadores são desenhados para caminhada de genoma. Caminhada de genoma é realizada usando o BD Clontech Genome Walking Kit de acordo com as instruções do fabricante, usando iniciadores de PCR primários identificados como SEQ ID NO. 28 e SEQ ID NO. 29 e iniciadores de PCR aninhados identificados como SEQ ID NO. 30 e SEQ ID NO. 31. Seqüências obtidas de ambas caminhadas

de genoma à montante e à jusante são linhadas e fundidas com a seqüência parcial previamente obtida para construir o gene glicerol-3-fosfato desidrogenase de *I. orientalis*.

Exemplo 4B: Construção de um plasmídeo (pMM28, Fig. 5) contendo o cassete de gene KmCYB2 entre seqüências de repetição direta de *K. thermotolerans*.

5 O inteiro cassete de gene CYB2 (KmCYB2) de *K. marxianus*, incluindo regiões promotoras e terminadoras, é amplificado PCR a partir de ADN genômico de um *K. marxianus* tipo selvagem linhagem designada como CD21, com introdução de sítios de restrição BamHI e Sall, através de PCR usando iniciadores identificados como SEQ ID NO. 32 e SEQ ID NO. 33. O produto de PCR é ligado a um vetor comercial designado como pUC18 (de
10 Invitrogen Corp., Carlsbad, Ca, USA) que é digerido com BamHI e Sall. O plasmídeo resultante é designado como pMM25.

Uma seqüência de 705 pb identificada como SEQ ID NO. 34 é amplificada por PCR a partir de ADN genômico de *K. thermotolerans*, com introdução de sítios de restrição SphI e Sall, usando iniciadores identificados como SEQ ID NO. 35 e SEQ ID NO. 36. Esta seqüên-
15 cia de *K. thermotolerans* não codifica qualquer proteína ativa. Plasmídeo pMM25 é digerido com SphI e Sall e a seqüência de *K. thermotolerans* é ligada ao mesmo à montante (5') do cassete KmCYB2 para formar um plasmídeo designado como pMM27.

Uma seqüência de *K. thermotolerans* idêntica é amplificada por PCR com adição de sítios de restrição BamHI e XmaI, usando primers identificados como SEQ ID NO. 37 e SEQ
20 ID NO. 38. Plasmídeo pMM27 é digerido com BamHI e XmaI e a seqüência de *K. thermotolerans* é ligada ao mesmo à jusante (3') a partir do cassete KmCYB2 para formar um plasmídeo designado como pMM28 (Fig. 5). Plasmídeo pMM28 contém o cassete KmCYB2 flanqueado por seqüências de repetição direta de *K. thermotolerans*, ambas orientadas na mesma direção.

25 Exemplo 4C: Construção de um plasmídeo (pMI321, Fig. 7) contendo um cassete de gene higromicina e um cassete de gene LDH de *L. helveticus*

Um fragmento de sonda de 920 pb do gene PGK1 de *C. sonorensis* é obtido de ADN genômico de *C. sonorensis* na mesma maneira como descrito no Exemplo 22 de WO 02/042471, usando iniciadores identificados como SEQ ID NO. 39 e SEQ ID NO. 40. ADN
30 genômico é isolado de uma linhagem de *I. orientalis* em crescimento e re-suspenso em Tris-HCl 10 mM + EDTA 1 mM (pH 8) (TE). O ADN genômico de *I. orientalis* é cortado com HindIII e um Southern blot é preparado e hibridizado usando processos padrões com o gene PGK1 de *C. sonorensis* como uma sonda. Fragmentos de tamanho de ~2 kb são isolados de gel agarose e clonados em um plasmídeo de corte HindIII para gerar uma biblioteca fracionada em tamanho, que é transformada em *E. coli*. Hibridização de colônia da biblioteca
35 fracionada em tamanho com a sonda PGK1 resulta em isolamento de um plasmídeo contendo um fragmento HindIII com maioria das seqüências codificando proteína PGK1 (*I-*

oPGK1) de *I. orientalis* mas nenhuma sequência promotora, como verificado através de seqüenciamento.

Fragmentos genômicos contendo a região promotora loPGK1 são obtidos com amplificação 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). Uma mistura de um ligador identificado como SEQ ID NO. 41 e um ligador identificado como SEQ ID NO. 42 é ligada a ADN genômico de *I. orientalis* digerido com HaeIII com T4 ADN ligase (New England BioLabs). Amostras das misturas de ligação são usadas como moldes para reações PCR de 50 μ L contendo 0,1 μ M de um iniciador identificado como SEQ ID NO. 43 e 1 μ M de um iniciador identificado como SEQ ID NO. 44. A mistura de reação é aquecida a 94°C por 3 minutos após 2 U de Dynazyme EXT serem adicionadas. As reações são feitas em 30 ciclos como se segue: 1 minuto a 94°C, 2 minutos a 68°C e 2 minutos a 72°C, com uma extensão final de 10 minutos a 72°C. Uma amostra diluída desta primeira amplificação PCR é usada como o molde em uma reação PCR aninhada (50 μ L) contendo 0,05 μ M de um iniciador identificado como SEQ ID NO. 45 e 0,5 μ M de um iniciador identificado como SEQ ID NO. 46. A mistura de reação é aquecida a 94°C por 3 minutos após 2 U de Dynazyme EXT serem adicionadas. As reações são feitas em 30 ciclos como se segue: 1 minuto a 94°C, 2 minutos a 67°C e 2 minutos em 72°C, com uma extensão final de 10 minutos a 72°C.

Um fragmento de PCR de ~600 pb é isolado e seqüenciado. Iniciadores aninhados identificados como SEQ ID NO. 47 e SEQ ID NO. 48 são desenhados e usados em uma amplificação PCR mediada com ligação junto com oligonucleotídeos identificados como SEQ ID NO. 49 e SEQ ID NO. 50 similarmente como acima, exceto que ADN de *I. orientalis* digerido com SspI é usado e a PCR é realizada usando uma temperatura de anelamento de 65°C.

A região promotora PGK1 de *I. orientalis* é amplificada por PCR usando primers identificados como SEQ ID NO. 51 e SEQ ID NO. 52 e o ADN genômico de *I. orientalis* como o molde. O fragmento é enchido usando a enzima Klenow e então cortado com XbaI. Um fragmento de 633 pb é isolado com gel e ligado a um fragmento de 4428 pb obtido por digestão de um plasmídeo designado como pMI270 (descrito em Fig. 4 de WO 03/049525) com XhoI, enchendo o fragmento usando a enzima Klenow e dNTP 0,1 mM, e digerindo com XbaI. Plasmídeo pMI270 contém o gene higromicina de *E. coli* ligado a um promotor PGK1 de *C. sonorensis* e um terminador GAL10 de *S. cerevisiae*. O resultante plasmídeo é designado pMI318 (Fig. 6). Plasmídeo pMI318 contém o gene higromicina de *E. coli* sob o controle do promotor PGK1 de *I. orientalis* e o terminador GAL10 de *S. cerevisiae*.

O promotor PGK1 de *I. orientalis* é amplificado por PCR usando iniciadores identificados como SEQ ID NO. 53 e SEQ ID NO. 54 e ADN genômico de *I. orientalis* como o molde. O fragmento é enchido usando a enzima Klenow e dNTP 0,1 mM, e então corte com

NcoI. Um fragmento de 633 pb é isolado com gel. Plasmídeo pVR1 (descrito em WO 03/102152, Figura 7) contem o gene LDH de *L. helveticus* sob o controle do promotor TEF1 de *S. cerevisiae* e o terminador CYC1 de *S. cerevisiae*. Plasmídeo pVR1 é digerido com XhoI, enchido usando a enzima Klenow, e corte com NcoI. Um fragmento de 7386 pb de plasmídeo pVR1 é ligado ao fragmento de promotor loPGK1 de 633 pb. O plasmídeo resultante é designado pMI320. Plasmídeo pMI320 contem o gene LDH de *L. helveticus* sob o controle do promotor loPGK1 e terminador CYC1 de *S. cerevisiae*.

Plasmídeos pMI318 e pMI320 são digeridos com ApaI e NotI. Um fragmento de 5008 pb de plasmídeo pMI318 é ligado a um fragmento de 1995 pb de plasmídeo pMI320 para formar plasmídeo pMI321 (Fig. 7).

O gene higromicina (e seu terminador) é posicionado sobre plasmídeo pMI321 entre duas cópias do promotor loPGK1, que servem como seqüências de repetição direta.

Exemplo 4D: Construção de um plasmídeo (pMI355, Fig. 8) tendo o cassete de gene higromicina de *E. coli*, o cassete de gene LDH de *L. helveticus*, e a região flanqueante 5' loPDC1A

Uma biblioteca genômica de *I. orientalis* tipo selvagem linhagem ATCC PTA-6658 é construída no vetor cosmídeo SuperCos1 (Stratagene) de acordo com instruções providas pelo fabricante. Seqüências semelhantes PDC são amplificadas por PCR a partir de ADN genômico da linhagem com iniciadores designados como SEQ ID NO. 55 e SEQ ID NO. 56. Um fragmento de 700 pb de um gene PDC é amplificado. A biblioteca genômica é separada usando técnicas de hibridização com fragmentos de PCR marcados como a sonda como descrito em WO 03/049525 e clones cosmídeos contendo o gene PDC são isolados e seqüenciados. A região 5' PDC1A de *I. orientalis* a partir de 1000 pb para 167 pb à montante do início do quadro de leitura aberto é amplificada por PCR usando iniciadores identificados como SEQ ID NO. 57 e SEQ ID NO. 58 e o ADN cosmídeo PDC1A de *I. orientalis* como o molde. O fragmento é cortado com Sall e SacI. Um fragmento de 836 pb é isolado com gel e ligado a um fragmento de 6992 pb obtido por digestão de plasmídeo pMI321 ((Fig. 7, Exemplo 4C) com Sall e SacI. O resultante plasmídeo é chamado pMI355 (Fig. 8).

Exemplo 4E: Construção de plasmídeos (pMI356 e pMI357 (Fig. 9)) contendo a região flanqueante 5' loPDC1A, o cassete de gene higromicina de *E. coli*, o cassete de gene LDH de *L. helveticus*, e uma região flanqueante 3' loPDC1A.

A região 3' PDC1A de *I. orientalis* correspondendo a seqüências de 524 pb à montante para 217 pb à jusante do códon de interrupção de tradução PDC é amplificada por PCR usando iniciadores identificados como SEQ ID NO. 59 e SEQ ID NO. 60 e o ADN cosmídeo PDC1A de *I. orientalis* (Exemplo 4D) como o molde. O fragmento é cortado com ApaI e SmaI. Um fragmento de 630 pb é isolado com gel e ligado a um fragmento de 7809 pb obtido por digestão de plasmídeo pMI355 (Fi. 8, Ex. 4D) com ApaI e SmaI. O resultante

plasmídeo é chamado pMI357 (Fig. 9). Ele contém cassetes higromicina e LDH de plasmídeo pMI355 entre o flanco 5' e uma porção do flanco 3' do gene *loPDC1A*.

Plasmídeo pMI356 é construído da mesma maneira, exceto uma diferente seção da região 3' *PDC1A* de *I. orientalis* é usada.

5 Exemplo 4F: Construção de plasmídeo pMI433 (Fig. 10 contendo a região flanqueante 5' *loPDC1A*, um cassete de gene *ScMEL5*, o cassete de gene LDH de *L. helveticus* e a região flanqueante 3' *loPDC1A*.

O promotor PGK1 de *I. orientalis* é amplificado por PCR usando primers identificados como SEQ ID NO. 61 e SEQ ID NO. 62 e o ADN genômico de *I. orientalis* como o molde. O fragmento é enchido usando a enzima Klenow e dNTP 0,1 mM, e então cortado com SphI. Um fragmento de 669 pb é isolado com gel. Um plasmídeo designado como pMI233 (descrito na Fig. 23C de WO 03/049525) é cortado com XhoI. O fragmento é enchido com a enzima Klenow e cortado com SphI. Os fragmentos de 4534 pb e 669 pb são ligados e o resultante plasmídeo é chamado pMI319. Plasmídeo pMI319 contém o gene *MEL5* (*Sc-*
10 *MEL5*) de *S. cerevisiae* e a região promotora *loPGK1*.
15

Plasmídeo pMI319 é cortado com Apal, tornado de extremidade embotada com T4 polimerase, e cortado com NotI. Um fragmento de 2317 pb é isolado com gel. Ele é ligado a um fragmento de 6498 pb obtido através de digestão de plasmídeo pMI357 (Exemplo 4E) com Sall, tornando o mesmo embotado na extremidade com a enzima Klenow e então cortando com NotI. O resultante plasmídeo contém o gene *ScMEL5* (com seu terminador nativo) no lugar do gene higromicina de plasmídeo pMI357. O resultante plasmídeo é designado pMI433 (Fig. 10).
20

Exemplo 4G: Construção de plasmídeos pMI449 (Fig. 11) e pMI454 (Fig. 12) contendo região flanqueante 5' *CYB2* de *I. orientalis*, cassete de gene *ScMEL5* entre seqüências de repetição direta de *K. thermotolerans* e região flanqueante 3' *CYB2* de *I. orientalis*.
25

Plasmídeo pMM28 (Fig. 5, Ex. 4B) é digerido com BamHI, enchido com a enzima Klenow, e digerido com Sall. O fragmento de 4077 pb assim obtido é ligado a um fragmento NotI (enchido com enzima Klenow)-Sall de 2317 pb de pMI433 (Fig. 10, Ex. 4F). O resultante plasmídeo é designado pMI445.

30 A região flanqueante 3' do gene *L-lactato:ferricitocromo c* óxido redutase (*loCYB2A*) de *I. orientalis* (correspondendo a seqüências 90 a 676 pb à jusante do início do quadro de leitura aberto previsto) é amplificada por PCR usando iniciadores identificados como SEQ ID NO. 63 e SEQ ID NO. 64, usando um clone cosmídeo *CYB2-2* como um molde. O produto de PCR é digerido com SacI e SmaI e o fragmento de 607 pb é ligado ao fragmento SacI-SmaI de 6386 pb de plasmídeo pMI445. O resultante plasmídeo é designado pMI448.
35

A região flanqueante 5' *loCYB2A* (correspondendo a seqüências de 913 a 487 pb à montante do início do quadro de leitura aberto previsto) é amplificada por PCR usando inici-

adores identificados como SEQ ID NO. 65 e SEQ ID NO. 66, novamente usando o clone cosmídeo CYB2-2 como um molde. O produto de PCR é digerido com SphI e o fragmento de 454 pb é ligado ao fragmento de 6993 pb SphI obtido através de digestão parcial de pMI448. O resultante plasmídeo é designado pMI449 (Fig. 11).

5 A região flanqueante 5' loCYB2A (correspondendo a seqüências de 466 a 7 pb à montante do quadro de leitura aberto previsto) é amplificada por PCR usando iniciadores identificados como SEQ ID NO. 67 e SEQ ID NO. 68, novamente usando o clone cosmídeo CYB2-2 como o molde. O produto de PCR é digerido com SphI e o fragmento de 493 pb é ligado ao fragmento SphI de 6993 pb obtido através de digestão parcial de plasmídeo pMI448. O resultante plasmídeo é designado pMI453.

10 A região flanqueante 3' loCYB2A (correspondendo a seqüências de 402 pb à montante a 77 pb à jusante do códon de interrupção previsto) é amplificada por PCR usando iniciadores identificados como SEQ ID NO. 69 e SEQ ID NO. 70, usando o cosmídeo CYB2-2 como um molde. O produto de PCR é digerido com ApaI e SmaI e o fragmento de 506 pb é ligado ao fragmento ApaI-SmaI de 6886 pb de plasmídeo pMI453. O resultante plasmídeo é designado pMI454 (Fig. 12).

Exemplo 4H: Construção de um plasmídeo (pBH165, Fig. 13) contendo um fragmento à montante do gene loGPD1, uma primeira seção de repetição direta de *K. thermotolerans*, um cassete de gene MEL5, uma segunda seção de repetição direta de *K. thermotolerans*, e um fragmento à jusante do gene loGPD1.

Plasmídeo pMI449 é digerido com NdeI e SbfI para excisar a homologia flanqueante CYB2A. Um fragmento de 6,8 kbp é purificado com gel e desfosforilado. Um fragmento de 302 pb do gene loGPD1 de Exemplo 4A (correspondendo a pares de bases 1-302 a partir de códon de início do gene) é amplificada por PCR usando iniciadores identificados como SEQ ID NO. 71 e SEQ ID NO. 72. O produto de PCR é purificado com gel, digerido com NdeI e SbfI, e ligado ao fragmento de 6,8 kbp de plasmídeo pMI449 para produzir plasmídeo pBH164. Plasmídeo pBH164 é então digerido com XmaI e EcoRI para excisar a homologia flanqueante CYB2A 3'. Um fragmento de 6,5 kbp é purificado com gel e desfosforilado. Um fragmento de 346 pb do gene loGPD1 de Exemplo 4A (correspondendo a pares de bases 322-668 a partir do códon de partida) é amplificado por PCR usando iniciadores identificados como SEQ ID NO. 73 e SEQ ID NO. 74. O produto de PCR é purificado com gel, digerido com XmaI e EcoRI, e ligado ao fragmento de 6,5 kbp obtido de pBH164 para produzir pBH165 (Fig. 13).

Plasmídeo pBH165 contém, em ordem de transcrição, o fragmento de 302 pb do gene loGPD1, uma primeira seção de repetição direta de *K. thermotolerans*, um cassete de gene MEL5, uma segunda seção de repetição direta de *K. thermotolerans*, e o fragmento de 346 pb do gene loGPD1. Ele é desenhado para inserção no locus do gene loGPD1 nativo

(com interrupção do gene), seguido por um loop-out do cassete de gene MEL5.

Exemplo 4I: Geração de um mutante de *I. orientalis* (CD1184) com genes *IoPDC1A* e *IoPDC1B* suprimidos e gene *LhLDH* integrado em uma etapa através de transformação de linhagem de *I. orientalis* tipo selvagem com plasmídeo pMI356 (Ex. 4F).

5 *I. orientalis* tipo selvagem linhagem ATCC PTA-6658 é transformada com plasmídeo pMI356 usando processos padrões. Linhagens transformadas que crescem sobre placas de higromicina são cultivadas. Um transformante que não produz etanol é selecionado para Southern analysis, que confirma a supressão de ambos alelos *IoPDC1A* e inserção de pelo menos uma cópia do gene *LhLDH*. Esta linhagem é designada CD1184.

10 Exemplo 4J: Geração de linhagem mutante de *I. orientalis* (CD1496) através de transformação sucessiva de linhagem CD1184 (Ex. 4I) com plasmídeo pMI449 (Ex. 4G, Fig. 11) e pMI454 (Ex. 4G, Fig. 12), seguido por mutagenese.

Linhagem CD1184 é transformada com plasmídeo pM449 usando o processo de acetato de lítio e transformantes (colônias azuis) são selecionados baseado em atividade melibiose sobre placas YPD X-a-gal. A substituição do gene *IoCYB2A* de linhagem CD1184 é confirmada por PCR de colônia e análise Southern em alguns dos transformantes. O marcador MEL5 é looped out de um daqueles transformantes via um evento de recombinação homóloga através de seqüências de repetição de *K. thermotolerans*, como confirmado por análise Southern. O segundo alelo *CYB2A* é então suprimido deste transformante usando plasmídeo pMI454. Transformantes são analisados por PCR de colônia para a ausência de um produto de PCR específico de *CYB2A* de 1000 pb. O marcador MEL5 de plasmídeo pMI454 é looped out de um transformante tendo uma supressão do segundo alelo *CYB2A* via recombinação como antes. Este transformante é designado linhagem CD1436. Linhagem CD1436 tem uma supressão de ambos genes *PDC1* (com substituição através de um cassete de gene *L-LDH* funcional), e uma supressão de cada um de seus dois genes *IoCYB2* nativos.

20 Linhagem CD1436 é submetida a mutagenese SEM usando as condições mostradas no Exemplo 1A, exceto que as condições de exposição são 8 μ L por 1 hora. Células mutagenizadas são deixadas em recuperação por 6 horas em 200 μ L de meio YP + 20 g/L glicose e então revestidas sobre placas de PDA + 35 g/L de ácido láctico e incubadas por uma semana a 30°C. Uma linhagem que produz mais lactato e menos glicerol que linhagem CD1436 é designada linhagem CD1496.

30 Exemplo 4K: Transformação de linhagens CD1184 (Ex. 4I) e CD1496 (Ex. 4J) com plasmídeo pBH165 (Ex. 4H, Fig. 13), seguido por loop-out do marcador de seleção para produzir linhagens transformantes CD1667 e CD1671, respectivamente, que têm um alelo *GPD1* simples suprimido.

Linhagem CD1184 é crescida e transformada com 5 μ g do fragmento de 4,4 kbp

obtido através de digestão de plasmídeo pBH165 com NdeI e EcoRI. Transformantes são selecionados sobre placas de base nitrogênio levedura (YNB) + 2% melibiose revestidas com x- α -gal(--4-cloro-3-indolil-aD-galacto piranosídeo). Transformantes de cor azul são visíveis após ~4 dias de crescimento a 30°C. Oito transformantes são retirados e revestidos para colônias simples sobre placas de YP + 20 g/L de glicose contendo x- α -gal. Uma colônia azul simples para cada transformante é retirada e novamente feita tira para placas de YP + 20 g/L de glicose. ADN genômico é isolado dos transformantes. Interrupção de um alelo do gene *loGPD1* é verificada por PCR usando iniciadores identificados como SEQ ID NO. 75 e SEQ ID NO. 76. Cinco transformantes exibem o esperado produto de ~2 kb. Um daqueles transformantes é designado como linhagem CD1655. Interrupção de uma cópia do gene *loGPD1* nativo é ainda verificada por PCR usando iniciadores designados como SEQ ID NO. 77 e SEQ ID NO. 78.

Linhagem CD1655 é crescida por vários rounds em YP + 100 g/L glicose a 30°C. Uma série de diluições é revestida sobre placas YP + 20 g/L (??) revestidas com x- α -gal, e crescidas por toda noite a 30°C. Uma colônia branca (indicativa do loop-out do cassete marcador MEL 5) é selecionada e novamente feita listra para placas de YP + 20 g/L glicose + x- α -gal. Uma colônia branca é selecionada. Interrupção de um alelo do gene *loGPD1* nativo é verificada por PCR usando iniciadores identificados como SEQ ID NO. 69 e SEQ ID NO. 80. Este transformante é designado como linhagem CD1667.

Linhagem CD1496 é transformada da mesma maneira. Um transformante exibindo a esperada banda de ~2 kbp em PCR é designada como linhagem CD1657. Interrupção de um alelo do gene *loGPD1* nativo é verificada por PCR como descrito para linhagem CD1655. Linhagem CD1657 é ainda crescida por vários rounds, e uma colônia mostrando uma supressão do cassete de gene marcador MEL5 é selecionada e designada como linhagem CD1671. Interrupção de um alelo do gene *loGPD1* nativo é verificada por PCR como antes.

Exemplo 4L: Transformação de linhagens CD1667 (Ex. 4K) e CD1671 (Ex. 4K) com plasmídeo pBH165 (Ex. 4H, Fig. 13) para produzir linhagens transformantes CD1688 e CD1690, respectivamente, com ambos alelos *loGPD1* suprimidos.

Linhagem CD1667 é transformada com 5 μ g de um fragmento de 4,4 kbp obtido através de digestão de plasmídeo pBH165 com NdeI e EcoRI. Transformantes são selecionados sobre placas de YNB + 2% melibiose revestidas com x- α -gal. Transformantes de cor azul são visíveis após ~4 dias de crescimento a 30°C. Dez transformantes são retirados e revestidos para colônias simples sobre placas de YP + 20 g/L de glicose contendo x- α -gal. Uma colônia azul simples para cada transformante é retirada e novamente feita listra para placas de YP + 20 g/L glicose. ADN genômico é isolado dos transformantes. Interrupção do segundo alelo do gene *loGPD1* é verificada em três transformantes por PCR usando inicia-

dores identificados como SEQ ID NO. 81 e SEQ ID NO. 82. Um destes transformantes é designado como linhagem CD1688.

Linhagem CD1671 é transformada da mesma maneira. PCR mostra que o segundo alelo do gene *loGPD1* é interrompido em um transformante, que é designado linhagem CD1690.

Exemplo 5: Cultivação de cultura de batelada micro-aeróbica de linhagens CD1184 (Ex. 4I) e CD1688 (Ex. 4L) em uma OUR de 5,5-5,6.

Um reator de cultura de batelada de estágio simples contendo um meio definido que inclui sulfato de amônio, dióxido de fosfato de potássio, e sulfato de magnésio, elementos em traços, vitaminas, agente antiespumante, e cerca de 50 g/L de glicose é inoculado com 1 mL de linhagem CD1688. O pH do meio é ajustado para cerca de 3,5 antes de adição das células. O pH da cultura é deixado cair para 3,0 quando células crescem e começam a produzir ácido láctico. A seguir, pH é mantido em cerca de 3,0 através de adição de hidróxido de potássio. Glicose é alimentada para a fermentação em cerca de 1-2 g/L/h até um total de 136,1 g/L de glicose terem sido adicionados. células são cultivadas a 30°C sob condições de aeração que conduzem a uma taxa de tomada de oxigênio de cerca de 5,5-5,6 mmol/L/h.

Linhagem CD1688 produz lactato em uma taxa de 1,02 g/L-h até o título de lactato ser aproximadamente 70 g/L. Rendimento de lactato através deste ponto é cerca de 74%. Produção para esta linhagem é interrompida após 77 horas, em cujo momento o caldo de fermentação contém 15,3 g/L de glicose. Taxa de produção total de lactato é de 1,06 g/L-h, e rendimento total para lactato é de 70%. Rendimentos para piruvato, glicerol e dióxido de carbono para linhagem CD1688 são 1,9%, 0% e 23,7%, respectivamente. Rendimento para biomassa é de 3,5%.

Para comparação, linhagem CD1184 (não um exemplo da invenção) é cultivada sob condições similares. Linhagem CD1184 produz lactato em uma taxa de 1,24 g/L-h até o título de lactato ser aproximadamente 70 g/L. Rendimento de lactato através deste ponto é de cerca de 74%. Produção para esta linhagem é interrompida após 77 horas, em cujo momento o caldo de fermentação contém 15,3 g/L de glicose. Taxa de produção total de lactato é de 1,06 g/L-h, e rendimento total para lactato é de 70%. Rendimentos para piruvato, glicerol e dióxido de carbono para linhagem CD1184 são 2,1%, 9,3% e 15,9%, respectivamente. Rendimento para biomassa é de 3,2%.

Estes resultados mostram que sob estas condições de fermentação, supressão dos genes *loGPD1* nativos evita que a célula produza quantidades mensuráveis de glicerol. Como antes, a supressão deste gene (e a resultante falta de produção de glicerol) tem pequeno ou nenhum efeito sobre crescimento de célula.

Exemplo 6: Cultivo de cultura de batelada micro – aeróbica de linhagens CD1184

(Ex. 4I) e CD1688 (Ex. 4L) em uma OUR de 9,9-10.

Linhagens CD1688 e CD1184 são cultivadas separadamente na maneira genérica descrita no exemplo 5, exceto que condições de aeração são selecionadas para conduzirem a uma taxa de tomada de oxigênio de 9,9-10,0 mmoles/L/h, e nenhuma glicose é alimentada para o sistema durante a cultura. Cascas de levedura são adicionadas à cultura de linhagem CD1688.

Sob estas condições, linhagem CD1184 produz lactato em uma taxa de 1,87 g/L-h até o título de lactato ser aproximadamente 70 g/L. Rendimento de lactato através deste ponto é de cerca de 73%. Produção para esta linhagem é interrompida após 67,5 horas, em cujo momento a concentração de glicose no caldo de fermentação foi reduzida de 60 g/L para 2,1 g/L. Taxa de produção total de lactato é de 1,43 g/L-h, e rendimento total para lactato é de 70%. Rendimentos para piruvato, glicerol e dióxido de carbono para linhagem CD1184 são 2,1%, 5,7% e 21,5%, respectivamente. Rendimento para biomassa é de 4,4%.

Linhagem CD1688 produz lactato em uma taxa de 1,68 g/L-h até o título de lactato ser aproximadamente 70 g/L. Rendimento de lactato através deste ponto é cerca de 80%. Produção para esta linhagem é interrompida após 78 horas, em cujo momento a concentração de glicose no caldo de fermentação foi reduzida de 53,5 g/L para 4,8 g/L. Taxa de produção total de lactato é de 1,26 g/L-h, e rendimento total para lactato é de 77%. Rendimentos para piruvato, glicerol e dióxido de carbono para linhagem CD1688 são 1,2%, 0% e 23,2%, respectivamente. Rendimento para biomassa é de 5,9%. Como antes, estes resultados mostram que sob estas condições de fermentação, supressão dos genes *loGPD1* nativos evita que a célula produza quantidades mensuráveis de glicerol e que a supressão deste gene (e a resultante falta de produção de glicerol) não tem efeito sobre crescimento de célula. Em adição, supressão de *loGPD1* aperfeiçoa rendimento total de lactato.

Exemplo 7: Cultivos de cultura em batelada micro – aeróbica de linhagem CD1690 (Ex. 4L) em uma OUR de 5-6.

Linhagem CD1690 é cultivada na maneira genérica descrita no exemplo 5, exceto que condições de aeração são selecionadas para conduzirem a uma taxa de tomada de oxigênio de 5,75 mmoles/L/h, e o meio de fermentação é YP + 70 g/L glicose.

Sob estas condições, linhagem CD1690 produz lactato em uma taxa de 0,66 g/L-h até o título de lactato ser aproximadamente 70 g/L. Rendimento de lactato através deste ponto é de cerca de 78%. Produção para esta linhagem é interrompida após 121 horas, em cujo momento a concentração de glicose no caldo de fermentação foi reduzida para 23,8 g/L (fora de 127,9 g/L providos para a cultura). Taxa de produção total de lactato é de 0,61 g/L-h, e rendimento total para lactato é de 77%. Rendimentos para piruvato, glicerol, e dióxido de carbono são 0%, 0% e 31,1%, respectivamente. Rendimento para biomassa é de 2,4%. Novamente, estes resultados mostram que sob estas condições de fermentação, supressão

de ambos alelos *loGPD1* nativos evita que a célula produza quantidades mensuráveis de glicerol, e tem pequeno ou nenhum efeito sobre crescimento de célula.

A linhagem CD1690 é cultivada mais duas vezes na maneira genérica descrita no Exemplo 5 (usando o meio definido ali descrito), exceto que a OUR é de 5,2 mmoles/L/h e glicerol é adicionado ao caldo de fermentação. Na primeira corrida, 0,1 g/L de glicerol é adicionado e 1,0 g/L de glicerol é adicionado na segunda corrida.

Quando 0,1 g/L de glicerol é adicionado, linhagem CD1690 produz lactato em uma taxa de 0,74 g/L-h até o título de lactato ser aproximadamente 70 g/L. Rendimento de lactato através deste ponto é de cerca de 78%. Produção para esta linhagem é interrompida após 121 horas, em cujo momento a concentração de glicose no caldo de fermentação foi reduzida para 10,2 g (fora de 117,8 g/L providos para a cultura). Taxa de produção total de lactato é de 0,68 g/L-h, e rendimento total para lactato é de 76%. Rendimentos para piruvato, glicerol e dióxido de carbono são 0,2%, 0% e 25,3%, respectivamente. Rendimento para biomassa é de 4,1%.

Resultados muito similares são obtidos quando 1,0 g/L de glicerol é adicionado.

Estes resultados mostram inesperadamente que a adição de glicerol ao meio de fermentação tem pequeno ou nenhum efeito sobre a habilidade destes transformantes crescerem e produzirem lactato, à despeito de interrupção da habilidade nativa da célula para produzir glicerol.

Exemplo 8A: Construção de um plasmídeo (pTMC61 (Fig. 14)) contendo a região flanqueante 5' *loGPD1*, o cassete de gene higromicina de *E. coli* entre repetições diretas, e a região flanqueante 3' *loGPD1*.

O cassete de gene higromicina é amplificado por PCR usando iniciadores identificados como SEQ ID NO. 83 e SEQ ID NO. 84, com plasmídeo pMI356 (Ex. 4E, ver Fig. 9) como o molde. Condições de PCR são 95°C por 5 minutos (uma vez), 30 ciclos de 95°C (30 segundos), 56°C (30 segundos) e 72°C (2 minutos), seguido por um ciclo de 72°C por 10 minutos. O resultante produto de PCR é digerido com *SpeI* e *Sall*, e ligado sobre plasmídeo pBH165 (Ex. 4H, Fig. 13), que foi similarmente digerido, para produzir plasmídeo pTMC61 (Fig. 14).

Exemplo 8B: Transformação de linhagem de *I. orientalis* tipo selvagem selecionada com plasmídeo pBH165 (Ex. 4H, Fig. 13), seguido por loop-out do marcador de seleção para produzir linhagem transformante CD2624, que tem um alelo *GPD1* simples suprimido.

I. orientalis tipo selvagem linhagem ATCC PTA-6658 é crescida por muitas gerações em cultura contínua em um meio contendo uma baixa concentração de glicose e uma alta concentração de ácido láctico. Uma célula que cresce bem sob estas condições é isolada e designada como linhagem CD1822. Linhagem CD1822 produz etanol e glicerol quando cultivada em um meio contendo glicose como a fonte de carbono. A linhagem CD1822 é

desenvolvida e transformada com plasmídeo pBH165 da mesma maneira como descrito no Exemplo 4K. Transformantes são selecionados sobre placas de base nitrogênio levedura (YNB) + 2% melibiose revestidas com x- α -gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-a-D-galacto piranosídeo), como descrito no exemplo 4K, com uma colônia azul sendo retirada e feita novamente listra para placas de YP + 20 g/L de glicose. ADN genômico é isolado do transformante, e analisado para integração da construção de supressão através de dois conjuntos de reações PCR. O primeiro destes usou iniciadores designados como SEQ ID NO. 85 e SEQ ID NO. 86, e o segundo destes foi realizado com iniciadores designados como SEQ ID NO. 87 e SEQ ID NO. 88. Estes produziram produtos de PCR de 2,0 kbp e 1,4 kbp, respectivamente, indicando que um dos alelos GPD1 foi rompido. Uma terceira reação PCR é realizada, usando iniciadores designados como SEQ ID NO. 85 e SEQ ID NO. 88; isto produz um produto de 0,8 kbp indicando que um alelo GPD1 não-rompido está ainda presente no transformante. O transformante é designado como linhagem CD2624.

Exemplo 8C: Transformação de linhagem CD2624 (Ex. 8B) com plasmídeo pTMC61 (Ex. 8A, Fig. 14) para produzir linhagens transformantes CD2627, tendo ambos alelos I-oGPD1 suprimidos

PCR é realizada usando iniciadores identificados como SEQ ID NO. 89 e SEQ ID NO. 90, com plasmídeo pTMC61 como o molde. Um fragmento de 4,1 kbp é obtido, e é usado para transformar linhagem CD2624. Transformantes são selecionados sobre YPD + 300 μ g/mL de higromicina. ADN genômico é isolado de 100 dos transformantes, e usado como um molde em três conjuntos de reações PCR. O primeiro usa iniciadores identificados como SEQ ID NO. 91 e SEQ ID NO. 88, e produz um produto de 1,5 kbp em 30 dos transformantes. Uma segunda reação PCR é conduzida sobre ADN genômico daqueles 30 transformantes, usando iniciadores identificados como SEQ ID NO. 85 e SEQ ID NO. 92. Dez linhagens exibiram o esperado produto de 2,5 kbp. ADN genômico daquelas dez linhagens é então analisado usando iniciadores identificados como SEQ ID NO. 85 e SEQ ID NO. 88. Duas linhagens que não produzem um fragmento de 0,8 kbp têm ambos alelos GPD1 interrompidos. Estas são testadas para crescimento sobre placas de YNB + 2,0% melibiose. Uma linhagem é capaz de crescer, e é designada como linhagem CD2627.

Exemplo 8D: Cultivo micro – aeróbico de linhagem CD1822, linhagem CD2624 (Exemplo 8B) e linhagem CD2627 (Exemplo 8C).

Linhagens CD1822, CD2624 e CD2627 são cultivadas em fermentações em frasco de agitação micro – aeróbica em duplicata. As linhagens são crescidas por toda noite em 25 mL de um meio definido contendo ~100 g/mL de glicose, a 30°C e agitação de 250 rpm em frascos defletidos de 250 mL. O meio definido é como descrito em Peter M. Bruinenberg, Johannes P. Van Dijken and W. Alexander Schefferes, 1983, An Enzymatic Analysis of NADPH Production and Consumption in *Candida utilis*, J. General Microbiology vol. 129, pp.

965-971, exceto para a presença de adicional glicose como indicado e um aumento em ácido nicotínico para 5 mg/L.

As resultantes culturas são usadas para inoculação de 50 mL do meio definido contendo 100 g/L de glicose em frascos defletidos de 250 mL para uma OD₆₀₀ de 0,2. Estes frascos são então incubados em 100 rpm por 22 horas a 30°C. O meio é então analisado por HPLC para glicose, glicerol e etanol. Rendimento para biomassa também é determinado.

Linhagem CD1822 consome toda glicose durante a cultura de 22 horas, produzindo 6,0 g/kg de glicerol, 34,54 g/kg de etanol e biomassa para uma OD₆₀₀ de 14,8.

Linhagem CD2624, que tem uma interrupção de um alelo GPD1, consome toda glicose, produzindo 5,88 g/kg de glicerol e 35,25 g/kg de etanol. Biomassa é produzida para uma OD₆₀₀ de 14,5.

Linhagem CD2627, que tem uma interrupção de ambos alelos GPD1, consome 12,39 g/kg da glicose durante 22 horas. Produção de glicerol é de 0,34 g/kg. Produção de etanol é de 23,06 g/kg e biomassa é produzida para uma OD₆₀₀ de 11,5. Estes resultados indicam que interrupção dos alelos GPD1 em *I. orientalis* resulta em uma pequena redução em taxas de consumo de glicose, e uma pequena redução em produção de etanol e produção de biomassa, sob estas condições. Entretanto, linhagem CD2627 cresce bem e produz etanol bem, com mínima produção de glicerol. Os resultados ainda indicam que a habilidade dos supressores GPD1 crescerem e produzirem não é dependente da interrupção de atividade PDC ou a adição de um caminho a partir de piruvato para lactato.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> Natureworks LLC
Dundon, Catherine Asleson
Suominen, Pirkko
Aristidou, Aristos
Rush, Brian J.
Koivuranta, Kari
Hause, Benjamin Matthew
McMullin, Thomas W.
Roberg-Perez, Kevin

<120> "CÉLULAS DE LEVEDURA TENDO CAMINHO INTERROMPIDO A PARTIR DE
DIIDROXI ACETONA FOSFATO PARA GLICEROL"

<130> 1206A WO

<150> 60/781,674
<151> 2006-03-13

<160> 92

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 415
<212> PRT
<213> Issatchenkia orientalis

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(14)
<223> xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (161)..(161)
<223> xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (272)..(272)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (287)..(287)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (347)..(347)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 1

Met Phe Leu Ile Ser Lys Ser Leu His Phe Thr Arg Ser Xaa Ser Asn
1 5 10 15

Thr Ile Lys Thr Leu Asn Arg Ser Asn Ile Lys Met Val Ser Pro Ala
20 25 30

Glu Arg Leu Ser Thr Ile Ala Ser Thr Ile Lys Pro Asn Arg Lys Asp
35 40 45

Ser Thr Ser Leu Gln Pro Glu Asp Tyr Pro Glu His Pro Phe Lys Val
 50 55 60
 Thr Val Val Gly Ser Gly Asn Trp Gly Cys Thr Ile Ala Lys Val Ile
 65 70 75 80
 Ala Glu Asn Thr Val Glu Arg Pro Arg Gln Phe Gln Arg Asp Val Asn
 85 90 95
 Met Trp Val Tyr Glu Glu Leu Ile Glu Gly Glu Lys Leu Thr Glu Ile
 100 105 110
 Ile Asn Thr Lys His Glu Asn Val Lys Tyr Leu Pro Gly Ile Lys Leu
 115 120 125
 Pro Val Asn Val Val Ala Val Pro Asp Ile Val Glu Ala Cys Ala Gly
 130 135 140
 Ser Asp Leu Ile Val Phe Asn Ile Pro His Gln Phe Leu Pro Arg Ile
 145 150 155 160
 Xaa Ser Gln Leu Lys Gly Lys Val Asn Pro Lys Ala Arg Ala Ile Ser
 165 170 175
 Cys Leu Lys Gly Leu Asp Val Asn Pro Asn Gly Cys Lys Leu Leu Ser
 180 185 190
 Thr Val Ile Thr Glu Glu Leu Gly Ile Tyr Cys Gly Ala Leu Ser Gly
 195 200 205
 Ala Asn Leu Ala Pro Glu Val Ala Gln Cys Lys Trp Ser Glu Thr Thr
 210 215 220
 Val Ala Tyr Thr Ile Pro Asp Asp Phe Arg Gly Lys Gly Lys Asp Ile
 225 230 235 240
 Asp His Gln Ile Leu Lys Ser Leu Phe His Arg Pro Tyr Phe His Val
 245 250 255
 Arg Val Ile Ser Asp Val Ala Gly Ile Ser Ile Ala Gly Ala Leu Xaa
 260 265 270
 Asn Val Val Ala Met Ala Ala Gly Phe Val Glu Gly Leu Gly Xaa Gly
 275 280 285
 Asp Asn Ala Lys Ala Ala Val Met Arg Ile Gly Leu Val Glu Thr Ile
 290 295 300
 Gln Phe Ala Lys Thr Phe Phe Asp Gly Cys His Ala Ala Thr Phe Thr

130	135	140
Ala 145	Asn Pro Asp Ile Val 150	Asp Ala Ala Lys Asp 155
Ala Asp Ile Leu Val 160		
Phe Asn Ile Pro His 165	Gln Phe Leu Pro Lys 170	Val Cys Ser Gln Leu Lys 175
Gly Lys Ile Lys 180	Pro Gln Ala Arg Ala 185	Ile Ser Cys Leu Lys 190
Gly Phe		
Asp Val Gly 195	Lys Asp Gly Val Lys 200	Leu Leu Ser Thr Tyr 205
Ile Lys Asp		
Thr Leu 210	Asn Ile Glu Cys Gly 215	Ala Leu Ser Gly Ala 220
Asn Leu Ala Pro		
Glu 225	Val Ala Lys Glu Asn 230	Trp Ser Glu Thr Thr 235
Val Ala Tyr Gln Ile 240		
Pro Glu Asp Tyr Lys 245	Gly Ala Gly Lys Asp 250	Val Asp His Ser Leu Leu 255
Lys Ala Leu Phe 260	His Arg Pro Tyr Phe 265	His Val Asn Val Ile His Asp 270
Val Ala Gly 275	Ile Ser Val Ala Gly 280	Ala Leu Lys Asn Val Ile Ala Leu 285
Gly Cys 290	Gly Tyr Val Glu Gly 295	Leu Gly Trp Gly Asn 300
Asn Ala Ser Ala		
Ala 305	Ile Gln Arg Val Gly 310	Leu Ser Glu Met Ile 315
Thr Phe Gly Arg Met 320		
Phe Phe Pro Glu Cys 325	Arg Val Glu Thr Phe 330	Tyr Lys Glu Ser Ala Gly 335
Val Ala Asp Leu 340	Ile Thr Thr Cys Ala 345	Gly Gly Arg Asn Val Arg Val 350
Ala Lys His 355	Met Ala Ile Thr Gly 360	Lys Ser Ala Leu Glu Ala Glu Lys 365
Glu Leu 370	Leu Asn Gly Gln Ser 375	Ala Gln Gly Ile Ile 380
Thr Thr Lys Glu		
Val His 385	Glu Trp Leu Glu 390	Thr Cys Gly Lys Ile 395
Asn Glu Phe Pro Leu 400		

Phe Glu Ala Ile Tyr Gln Ile Thr Tyr Gly Asn Ala Ser Met Glu Gln
 405 410 415

Ile Pro Glu Met Ile Glu Glu Leu Glu Cys Ile Asp Tyr Asn Val Lys
 420 425 430

Lys His

<210> 3

<211> 391

<212> PRT

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 3

Met Ser Ala Ala Ala Asp Arg Leu Asn Leu Thr Ser Gly His Leu Asn
 1 5 10 15

Ala Gly Arg Lys Arg Ser Ser Ser Ser Val Ser Leu Lys Ala Ala Glu
 20 25 30

Lys Pro Phe Lys Val Thr Val Ile Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr Thr
 35 40 45

Ile Ala Lys Val Val Ala Glu Asn Cys Lys Gly Tyr Pro Glu Val Phe
 50 55 60

Ala Pro Ile Val Gln Met Trp Val Phe Glu Glu Glu Ile Asn Gly Glu
 65 70 75 80

Lys Leu Thr Glu Ile Ile Asn Thr Arg His Gln Asn Val Lys Tyr Leu
 85 90 95

Pro Gly Ile Thr Leu Pro Asp Asn Leu Val Ala Asn Pro Asp Leu Ile
 100 105 110

Asp Ser Val Lys Asp Val Asp Ile Ile Val Phe Asn Ile Pro His Gln
 115 120 125

Phe Leu Pro Arg Ile Cys Ser Gln Leu Lys Gly His Val Asp Ser His
 130 135 140

Val Arg Ala Ile Ser Cys Leu Lys Gly Phe Glu Val Gly Ala Lys Gly
 145 150 155 160

Val Gln Leu Leu Ser Ser Tyr Ile Thr Glu Glu Leu Gly Ile Gln Cys
 165 170 175

Gly Ala Leu Ser Gly Ala Asn Ile Ala Thr Glu Val Ala Gln Glu His
 180 185 190

Trp Ser Glu Thr Thr Val Ala Tyr His Ile Pro Lys Asp Phe Arg Gly
195 200 205

Glu Gly Lys Asp Val Asp His Lys Val Leu Lys Ala Leu Phe His Arg
210 215 220

Pro Tyr Phe His Val Ser Val Ile Glu Asp Val Ala Gly Ile Ser Ile
225 230 235 240

Cys Gly Ala Leu Lys Asn Val Val Ala Leu Gly Cys Gly Phe Val Glu
245 250 255

Gly Leu Gly Trp Gly Asn Asn Ala Ser Ala Ala Ile Gln Arg Val Gly
260 265 270

Leu Gly Glu Ile Ile Arg Phe Gly Gln Met Phe Phe Pro Glu Ser Arg
275 280 285

Glu Glu Thr Tyr Tyr Gln Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr
290 295 300

Thr Cys Ala Gly Gly Arg Asn Val Lys Val Ala Arg Leu Met Ala Thr
305 310 315 320

Ser Gly Lys Asp Ala Trp Glu Cys Glu Lys Glu Leu Leu Asn Gly Gln
325 330 335

Ser Ala Gln Gly Leu Ile Thr Cys Lys Glu Val His Glu Trp Leu Glu
340 345 350

Thr Cys Gly Ser Val Glu Asp Phe Pro Leu Phe Glu Ala Val Tyr Gln
355 360 365

Ile Val Tyr Asn Asn Tyr Pro Met Lys Asn Leu Pro Asp Met Ile Glu
370 375 380

Glu Leu Asp Leu His Glu Asp
385 390

<210> 4
<211> 440
<212> PRT
<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 4

Met Leu Ala Val Arg Arg Leu Thr Arg Tyr Thr Phe Leu Lys Arg Thr
1 5 10 15

His Pro Val Leu Tyr Thr Arg Arg Ala Tyr Lys Ile Leu Pro Ser Arg
20 25 30

Ser Thr Phe Leu Arg Arg Ser Leu Leu Gln Thr Gln Leu His Ser Lys
 35 40 45
 Met Thr Ala His Thr Asn Ile Lys Gln His Lys His Cys His Glu Asp
 50 55 60
 His Pro Ile Arg Arg Ser Asp Ser Ala Val Ser Ile Val His Leu Lys
 65 70 75 80
 Arg Ala Pro Phe Lys Val Thr Val Ile Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr
 85 90 95
 Thr Ile Ala Lys Val Ile Ala Glu Asn Thr Glu Leu His Ser His Ile
 100 105 110
 Phe Glu Pro Glu Val Arg Met Trp Val Phe Asp Glu Lys Ile Gly Asp
 115 120 125
 Glu Asn Leu Thr Asp Ile Ile Asn Thr Arg His Gln Asn Val Lys Tyr
 130 135 140
 Leu Pro Asn Ile Asp Leu Pro His Asn Leu Val Ala Asp Pro Asp Leu
 145 150 155 160
 Leu His Ser Ile Lys Gly Ala Asp Ile Leu Val Phe Asn Ile Pro His
 165 170 175
 Gln Phe Leu Pro Asn Ile Val Lys Gln Leu Gln Gly His Val Ala Pro
 180 185 190
 His Val Arg Ala Ile Ser Cys Leu Lys Gly Phe Glu Leu Gly Ser Lys
 195 200 205
 Gly Val Gln Leu Leu Ser Ser Tyr Val Thr Asp Glu Leu Gly Ile Gln
 210 215 220
 Cys Gly Ala Leu Ser Gly Ala Asn Leu Ala Pro Glu Val Ala Lys Glu
 225 230 235 240
 His Trp Ser Glu Thr Thr Val Ala Tyr Gln Leu Pro Lys Asp Tyr Gln
 245 250 255
 Gly Asp Gly Lys Asp Val Asp His Lys Ile Leu Lys Leu Leu Phe His
 260 265 270
 Arg Pro Tyr Phe His Val Asn Val Ile Asp Asp Val Ala Gly Ile Ser
 275 280 285
 Ile Ala Gly Ala Leu Lys Asn Val Val Ala Leu Ala Cys Gly Phe Val
 290 295 300

Glu Gly Met Gly Trp Gly Asn Asn Ala Ser Ala Ala Ile Gln Arg Leu
305 310 315 320

Gly Leu Gly Glu Ile Ile Lys Phe Gly Arg Met Phe Phe Pro Glu Ser
325 330 335

Lys Val Glu Thr Tyr Tyr Gln Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile
340 345 350

Thr Thr Cys Ser Gly Gly Arg Asn Val Lys Val Ala Thr Tyr Met Ala
355 360 365

Lys Thr Gly Lys Ser Ala Leu Glu Ala Glu Lys Glu Leu Leu Asn Gly
370 375 380

Gln Ser Ala Gln Gly Ile Ile Thr Cys Arg Glu Val His Glu Trp Leu
385 390 395 400

Gln Thr Cys Glu Leu Thr Gln Glu Phe Pro Leu Phe Glu Ala Val Tyr
405 410 415

Gln Ile Val Tyr Asn Asn Val Arg Met Glu Asp Leu Pro Glu Met Ile
420 425 430

Glu Glu Leu Asp Ile Asp Asp Glu
435 440

<210> 5
<211> 400
<212> PRT
<213> Candida glabrata

<400> 5

Met Ser Asn Ser Ala Ala Gly Arg Leu Asn Gln Thr Ser His Ile Leu
1 5 10 15

Asn Glu Ser Ile Lys Asn Asp Asp Ile Ser Leu Arg Arg Ser Gln Pro
20 25 30

Ser Thr Thr Ser Leu Gln Ala Leu Glu His Pro Phe Lys Val Thr Val
35 40 45

Ile Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr Thr Ile Ala Lys Val Val Ala Glu
50 55 60

Asn Thr Ala Leu Asn Pro His Leu Phe Val Ser Arg Val Asp Met Trp
65 70 75 80

Val Phe Glu Glu Lys Ile Asp Gly Lys Asn Leu Thr Glu Ile Ile Asn
85 90 95

Glu Gln His Glu Asn Val Lys Tyr Leu Pro Asp Ile Lys Leu Pro Glu
 100 105 110
 Asn Leu Val Ala Asn Pro Asn Leu Ile Asp Ser Val Lys Gly Ala Asp
 115 120 125
 Ile Leu Ile Phe Asn Ile Pro His Gln Phe Leu Pro Arg Ile Val Ser
 130 135 140
 Asn Leu Lys Asn His Val Gly Pro His Val Arg Ala Ile Ser Cys Leu
 145 150 155 160
 Lys Gly Phe Glu Val Gly Lys Lys Gly Val Gln Leu Leu Ser Ser Tyr
 165 170 175
 Val Thr Asp Glu Leu Gly Ile Gln Cys Gly Ala Leu Ser Gly Ala Asn
 180 185 190
 Leu Ala Pro Glu Val Ala Lys Glu His Trp Ser Glu Thr Thr Val Ala
 195 200 205
 Tyr His Ile Pro Lys Asp Phe Arg Gly Glu Gly Lys Asp Val Asp His
 210 215 220
 Lys Leu Leu Lys Ala Leu Phe His Arg Pro Tyr Phe His Val Asn Val
 225 230 235 240
 Ile Glu Asp Val Ala Gly Ile Ser Ile Ala Gly Ala Leu Lys Asn Val
 245 250 255
 Val Ala Leu Gly Cys Gly Phe Val Glu Gly Leu Gly Trp Gly Asn Asn
 260 265 270
 Ala Ala Ala Ala Ile Gln Arg Val Gly Leu Gly Glu Ile Ile Lys Phe
 275 280 285
 Gly Gln Met Phe Phe Pro Glu Ser Arg Val Gln Thr Tyr Tyr Gln Glu
 290 295 300
 Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr Thr Cys Ser Gly Gly Arg Asn
 305 310 315 320
 Val Arg Val Ala Lys His Met Ala Lys Thr Gly Lys Ser Ala Leu Asp
 325 330 335
 Ala Glu Lys Glu Leu Leu Asn Gly Gln Ser Ala Gln Gly Ile Ile Thr
 340 345 350
 Cys Lys Glu Val His Glu Trp Leu Glu Thr Cys Glu Met Thr His Glu
 355 360 365

Phe Pro Leu Phe Glu Ala Val Tyr Gln Ile Val Tyr Asn Asn Val Pro
 370 375 380

Met Lys Asn Leu Pro Asp Met Ile Glu Glu Leu Glu Cys Ile Ala Asp
 385 390 395 400

<210> 6

<211> 389

<212> PRT

<213> Debaryomyces hansenii

<400> 6

Met Ser Gln Tyr Arg Ala Asn Gln Arg Leu Gln Gln Leu Ser Asn Ile
 1 5 10 15

Leu Arg Pro Asn Gln Leu Ser Ala Glu Lys Ser Leu Lys Pro Glu Thr
 20 25 30

Pro Phe Lys Val Ala Val Ile Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr Thr Ile
 35 40 45

Ala Lys Val Leu Ala Glu Asn Thr Ala Glu Lys Pro Asp Thr Phe Ala
 50 55 60

Lys Gln Val Asp Met Trp Val Phe Gln Glu Lys Ile Asp Gly Thr Asn
 65 70 75 80

Leu Thr Glu Ile Ile Asn Asn Lys His Glu Asn Val Lys Tyr Leu Pro
 85 90 95

Gly Val Lys Leu Pro Glu Asn Leu His Ala Glu Pro Asp Ile Val Lys
 100 105 110

Ala Ala Gln Gly Ala Asp Leu Leu Val Phe Asn Leu Pro His Gln Phe
 115 120 125

Leu Pro Lys Ile Cys Lys Gln Leu Lys Gly Thr Leu Lys Pro Thr Thr
 130 135 140

Arg Ala Ile Ser Cys Leu Lys Gly Leu Glu Val Thr Pro Asp Gly Cys
 145 150 155 160

Lys Leu Leu Ser Thr Tyr Ile Thr Glu Asn Leu Gly Ile Glu Cys Gly
 165 170 175

Ala Leu Ser Gly Ala Asn Leu Ala Pro Glu Val Ala Arg Cys Lys Trp
 180 185 190

Ser Glu Thr Thr Val Ala Tyr Asn Ile Pro Ala Asp Phe Lys Gly Pro
 195 200 205

Gly Lys Asp Ile Asp Ser Ala Val Leu Lys Glu Ala Phe His Arg Pro
 210 215 220

Tyr Phe His Val Asn Val Ile Glu Asp Val Ala Gly Val Ser Val Ala
 225 230 235 240

Gly Ala Leu Lys Asn Ile Val Ala Ile Ala Val Gly Phe Val Glu Gly
 245 250 255

Leu Gly Trp Gly Asp Asn Ala Lys Ser Ala Ile Met Arg Val Gly Leu
 260 265 270

Ile Glu Thr Ile Asn Phe Ser Asn Met Phe Phe Pro Asn Ser Lys Pro
 275 280 285

Thr Thr Phe Thr His Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr Thr
 290 295 300

Cys Ser Gly Gly Arg Asn Val Lys Val Gly Arg His Met Ser Lys Thr
 305 310 315 320

Gly Glu Ser Ala Glu Glu Ala Glu Lys Lys Leu Leu Asn Gly Gln Ser
 325 330 335

Ser Gln Gly Ile Ile Thr Ala Lys Glu Val His Glu Leu Leu Ser Asn
 340 345 350

Val Gly Lys Thr Asp Gln Phe Pro Leu Phe Glu Ala Thr Tyr Gln Ile
 355 360 365

Ile Tyr Gly Asp Glu Ser Ile Gln Asn Leu Pro Asn Leu Leu Glu Asp
 370 375 380

His Ser Leu Phe Lys
 385

<210> 7
 <211> 393
 <212> PRT
 <213> Pichia jadinii

<400> 7

Met Leu Arg Ile Gly Lys Leu Asn Leu Ser Thr Met Ser Ser Ala Gln
 1 5 10 15

Gln Arg Leu Ala Gln Val Gly Ser His Leu Thr Ala Gln Lys Gln Ser
 20 25 30

Leu Ala Pro Gln Arg Pro Tyr Lys Ile Thr Val Ile Gly Ser Gly Asn
 35 40 45

Trp Gly Thr Thr Ile Ala Lys Val Leu Ala Glu Asn Ala Gly Leu Arg
 50 55 60
 Pro His Leu Phe Gln His Gln Val Asp Met Trp Val Phe Glu Glu Lys
 65 70 75 80
 Ile Asn Gly Val Asn Leu Thr Glu Ile Ile Asn Thr Gln His Glu Asn
 85 90 95
 Val Lys Tyr Leu Pro Gly Ile Lys Leu Pro Lys Asn Leu His Ala Glu
 100 105 110
 Pro Ser Ile Val Lys Ala Ala Glu Gly Ala Asp Leu Leu Val Phe Asn
 115 120 125
 Ile Pro His Gln Phe Leu Pro Gly Ile Cys Lys Gln Leu Ser Lys Ala
 130 135 140
 Thr Leu Lys Pro His Val Arg Ala Ile Ser Cys Leu Lys Gly Leu Glu
 145 150 155 160
 Val Thr Pro Asn Gly Cys Lys Leu Leu Ser Thr Tyr Ile Thr Glu His
 165 170 175
 Leu Gly Val His Cys Gly Ala Leu Ser Gly Ala Asn Leu Ala Pro Glu
 180 185 190
 Val Ala Lys Glu Lys Trp Ser Glu Thr Thr Val Ala Tyr Arg Leu Pro
 195 200 205
 Asn Asp Phe Gln Gly His Gly Lys Asp Ile Asp Arg Tyr Val Leu Arg
 210 215 220
 Ala Ala Phe His Arg Pro Tyr Phe His Val Arg Val Ile Glu Asp Val
 225 230 235 240
 Ala Gly Val Ser Leu Ala Gly Ala Leu Lys Asn Val Val Ala Leu Gly
 245 250 255
 Val Gly Phe Val His Gly Leu Asn Trp Gly Asp Asn Ala Ala Ser Ala
 260 265 270
 Ile Gln Arg Phe Gly Leu Asn Glu Thr Ile Lys Phe Ala Glu Val Phe
 275 280 285
 Phe Pro Gly Glu Thr Asn Gln Asp Thr Phe Thr Lys Glu Ser Ala Gly
 290 295 300
 Val Ala Asp Leu Ile Thr Thr Cys Ser Gly Gly Arg Asn Val Arg Val

305 310 315 320
 Ala Lys Ala Met Ala Ile Thr Gly Lys Ser Ala Val Glu Val Glu Arg
 325 330 335
 Glu Leu Leu Asn Gly Gln Ser Ala Gln Gly Ile Ile Thr Ser Lys Glu
 340 345 350
 Val His Glu Leu Leu Ala Ala Lys Asn Leu Thr Lys Glu Phe Pro Leu
 355 360 365
 Phe Glu Ala Ile Tyr Gln Ile Val Tyr Gly Thr Glu Ser Ile Glu Arg
 370 375 380
 Leu Pro Glu Leu Ile Glu Glu Asp Glu
 385 390

<210> 8
 <211> 248
 <212> PRT
 <213> Kluyveromyces marxianus
 <400> 8

Met Ser Ala Ala Pro Ile Ser Leu Arg Val Asn Ala Ala Leu Phe Asp
 1 5 10 15
 Val Asp Gly Thr Leu Ile Ile Ser Gln Gly Ala Ile Ala Glu Phe Trp
 20 25 30
 Arg Asp Phe Gly Lys Asp Lys Pro Tyr Phe Asp Ser Gln His Val Ile
 35 40 45
 Asp Ile Ser His Gly Trp Arg Thr Tyr Asp Val Ile Lys Lys Phe Ala
 50 55 60
 Pro Asp Tyr Ala Asn Glu Glu Tyr Val Thr Lys Leu Glu Gly Glu Ile
 65 70 75 80
 Pro Asp Lys Phe Gly Lys His Ala Ile Glu Val Pro Gly Ala Ile Lys
 85 90 95
 Leu Cys Ala Ala Leu Asn Ala Leu Pro Lys Glu Lys Trp Ala Val Ala
 100 105 110
 Thr Ser Gly Thr Phe Glu Met Ala His Lys Trp Phe Asp Ile Leu Gly
 115 120 125
 Ile Lys Arg Pro Ser Asn Phe Ile Thr Ala Asn Asp Val Lys Asn Gly
 130 135 140
 Lys Pro His Pro Glu Pro Tyr Leu Lys Gly Arg Asn Gly Leu Gly Tyr

145					150					155					160
Pro	Ile	Asn	Glu	Ala 165	Asn	Pro	Ala	Ala	Ser 170	Lys	Val	Ile	Val	Phe 175	Glu
Asp	Ala	Pro	Ala 180	Gly	Ile	Leu	Ala	Gly 185	Lys	Ala	Ala	Gly	Cys 190	Lys	Ile
Val	Gly	Ile 195	Ala	Thr	Thr	Phe	Asp 200	Lys	Glu	Phe	Leu	Ile 205	Glu	Lys	Gly
Cys	Asp 210	Ile	Val	Ile	Lys	Asp 215	His	Thr	Lys	Leu	Arg 220	Val	Ala	Ala	Tyr
His 225	Pro	Glu	Thr	Asp	Glu 230	Val	Glu	Phe	Val	Phe 235	Asp	Glu	Tyr	Leu	Tyr 240
Ala	Lys	Asp	Asp	Leu 245	Leu	Glu	Trp								

```
<210> 9
<211> 250
<212> PRT
<213> Saccharomyces cerevisiae
```

<400> 9

Met Gly Leu Thr Thr Lys Pro Leu Ser Leu Lys Val Asn Ala Ala Leu
1 5 10 15

Phe Asp Val Asp Gly Thr Ile Ile Ile Ser Gln Pro Ala Ile Ala Ala
20 25 30

Phe Trp Arg Asp Phe Gly Lys Asp Lys Pro Tyr Phe Asp Ala Glu His
35 40 45

Val Ile Gln Val Ser His Gly Trp Arg Thr Phe Asp Ala Ile Ala Lys
50 55 60

Phe Ala Pro Asp Phe Ala Asn Glu Glu Tyr Val Asn Lys Leu Glu Ala
65 70 75 80

Glu Ile Pro Val Lys Tyr Gly Glu Lys Ser Ile Glu Val Pro Gly Ala
85 90 95

Val Lys Leu Cys Asn Ala Leu Asn Ala Leu Pro Lys Glu Lys Trp Ala
100 105 110

Val Ala Thr Ser Gly Thr Arg Asp Met Ala Gln Lys Trp Phe Glu His
115 120 125

Leu Gly Ile Arg Arg Pro Lys Tyr Phe Ile Thr Ala Asn Asp Val Lys

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

<210> 10
 <211> 271
 <212> PRT
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*
 <400> 10

Met Lys Arg Phe Asn Val Leu Lys Tyr Ile Arg Thr Thr Lys Ala Asn
 1 5 10 15
 Ile Gln Thr Ile Ala Met Pro Leu Thr Thr Lys Pro Leu Ser Leu Lys
 20 25 30
 Ile Asn Ala Ala Leu Phe Asp Val Asp Gly Thr Ile Ile Ile Ser Gln
 35 40 45
 Pro Ala Ile Ala Ala Phe Trp Arg Asp Phe Gly Lys Asp Lys Pro Tyr
 50 55 60
 Phe Asp Ala Glu His Val Ile His Ile Ser His Gly Trp Arg Thr Tyr
 65 70 75 80
 Asp Ala Ile Ala Lys Phe Ala Pro Asp Phe Ala Asp Glu Glu Tyr Val
 85 90 95
 Asn Lys Leu Glu Gly Glu Ile Pro Glu Lys Tyr Gly Glu His ser Ile
 100 105 110
 Glu Val Pro Gly Ala Val Lys Leu Cys Asn Ala Leu Asn Ala Leu Pro

115 120 125
 Lys Glu Lys Trp Ala Val Ala Thr Ser Gly Thr Arg Asp Met Ala Lys
 130 135 140
 Lys Trp Phe Asp Ile Leu Lys Ile Lys Arg Pro Glu Tyr Phe Ile Thr
 145 150 155 160
 Ala Asn Asp Val Lys Gln Gly Lys Pro His Pro Glu Pro Tyr Leu Lys
 165 170 175
 Gly Arg Asn Gly Leu Gly Phe Pro Ile Asn Glu Gln Asp Pro Ser Lys
 180 185 190
 Ser Lys Val Val Val Phe Glu Asp Ala Pro Ala Gly Ile Ala Ala Gly
 195 200 205
 Lys Ala Ala Gly Cys Lys Ile Val Gly Ile Ala Thr Thr Phe Asp Leu
 210 215 220
 Asp Phe Leu Lys Glu Lys Gly Cys Asp Ile Ile Val Lys Asn His Glu
 225 230 235 240
 Ser Ile Arg Val Gly Glu Tyr Asn Ala Glu Thr Asp Glu Val Glu Leu
 245 250 255
 Ile Phe Asp Asp Tyr Leu Tyr Ala Lys Asp Asp Leu Leu Lys Trp
 260 265 270

<210> 11
 <211> 236
 <212> PRT
 <213> Schizosaccharomyces pombe

<400> 11

Met Ile Pro Glu Ala Cys Leu Phe Asp Met Asp Gly Leu Leu Val Asp
 1 5 10 15
 Thr Glu Ser Ile Tyr Thr Lys Ser Thr Asn Ile Ile Leu Lys Arg Tyr
 20 25 30
 Asn Lys Gly Pro Phe Ser Met Glu Val Lys Ala Lys Met Met Gly Arg
 35 40 45
 Thr Ser Lys Glu Ala Ser Arg Ile Phe Leu Asp Trp Ser Gly Ile Asp
 50 55 60
 Leu Thr Cys Glu Glu Tyr Ile Ala Leu Gln Arg Glu Thr Gln Ala Glu
 65 70 75 80
 Leu Trp Arg His Thr Lys Pro Leu Pro Gly Val Met Asn Leu Leu Ser

				85					90					95					
Lys	Leu	Lys	Ser 100	Leu	Asn	Ile	Pro	Ile 105	Ala	Leu	Ala	Thr	Ser 110	Ser	Asp				
Thr	His	Asn 115	Phe	Glu	Lys	Lys	Ser 120	Ala	His	Leu	Ser	His 125	Leu	Phe	Asp				
His	Phe 130	Asp	Gly	Asn	Ile	Ile 135	Thr	Gly	Asp	Asp	Pro 140	Arg	Leu	Pro	Val				
Gly 145	Arg	Gly	Lys	Pro	His 150	Pro	Asp	Ile	Trp	Phe 155	Ile	Ala	Leu	Lys	Met 160				
Ile	Asn	Asp	Lys	Arg 165	Lys	Ala	Gln	Gly	Gln 170	Ala	Glu	Ile	Leu	Pro 175	Glu				
Asn	Cys	Leu	Val 180	Phe	Glu	Asp	Ser	Ile 185	Thr	Gly	Val	Gln	Ser 190	Gly	Arg				
Ala	Ala	Gly 195	Met	Lys	Val	Val	Trp 200	Val	Pro	Asp	Val	Asn 205	Ile	Leu	Pro				
Phe	Phe 210	Ser	Leu	Ser	Pro	Glu 215	Gln	Ala	Ala	Asp	Lys 220	His	Ile	Thr	Lys				
Val 225	Leu	Ser	Leu	Glu	Asn 230	Phe	Asp	Val	Thr	Lys 235	Val								

<210>	12
<211>	246
<212>	PRT
<213>	Schizosaccharomyces pombe

<400> 12

Met Ala Ala Lys His Val Lys Tyr Met Ala Cys Leu Phe Asp Met Asp
1 5 10 15

Gly Leu Leu Val Asp Ser Glu Thr Ile Tyr Thr Lys Thr Thr Asn Leu
20 25 30

Ile Leu Asp Arg Tyr Gly Lys Asp Pro Leu Pro Ile Ser Val Lys Ala
35 40 45

Gln Met Met Gly Arg Pro Gly Ser Ala Ala Ala Lys Val Val Ile Asp
50 55 60

Trp Ser Asn Ile Pro Met Thr Pro Gln Gln Phe Val Asp Glu Gln Gln
65 70 75 80

Val Ile Arg Ala Lys Phe Trp Ser Ser Leu Lys Pro Met Pro Gly Ala

[illegible]

<210>	13
<211>	450
<212>	PRT
<213>	Schizosaccharomyces pombe

<400> 13

Met Ile Gly Pro Arg Leu Cys Ala Ala Thr Pro Arg Phe Pro Leu Val
1 5 10 15

Ser Leu Ala His Arg Asn Ser Lys Val Phe Ala Leu Ala Ser Ser Asn
20 25 30

Ala Val Ala Gln Arg Trp Gly Lys Arg Phe Tyr Ala Pro Ile Glu Thr
35 40 45

Glu Thr Pro His Lys Val Gly Val Glu Phe Glu Glu Ser Lys Asp Arg
50 55 60

Ile Phe Thr Ser Pro Gln Lys Tyr Val Gln Gly Arg His Ala Phe Thr

65		70		75		80									
Arg	Ser	Tyr	Met	Tyr 85	Val	Lys	Lys	Trp	Ala 90	Thr	Lys	Ser	Ala	Val 95	Val
Leu	Ala	Asp	Gln 100	Asn	Val	Trp	Asn	Ile 105	Cys	Ala	Asn	Lys	Ile 110	Val	Asp
Ser	Leu	Ser 115	Gln	Asn	Gly	Met	Thr 120	Val	Thr	Lys	Leu	Val 125	Phe	Gly	Gly
Glu	Ala 130	Ser	Leu	Val	Glu	Leu 135	Asp	Lys	Leu	Arg	Lys 140	Gln	Cys	Pro	Asp
Asp 145	Thr	Gln	Val	Ile	Ile 150	Gly	Val	Gly	Gly	Gly 155	Lys	Thr	Met	Asp	Ser 160
Ala	Lys	Tyr	Ile	Ala 165	His	Ser	Met	Asn	Leu 170	Pro	Ser	Ile	Ile	Cys 175	Pro
Thr	Thr	Ala	Ser 180	Ser	Asp	Ala	Ala	Thr 185	Ser	Ser	Leu	Ser	Val 190	Ile	Tyr
Thr	Pro	Asp 195	Gly	Gln	Phe	Gln	Lys 200	Tyr	Ser	Phe	Tyr	Pro 205	Leu	Asn	Pro
Asn	Leu 210	Ile	Phe	Ile	Asp	Thr 215	Asp	Val	Ile	Val	Arg 220	Ala	Pro	Val	Arg
Phe 225	Leu	Ile	Ser	Gly	Ile 230	Gly	Asp	Ala	Leu	Ser 235	Thr	Trp	Val	Glu	Thr 240
Glu	Ser	Val	Ile	Arg 245	Ser	Asn	Ser	Thr	Ser 250	Phe	Ala	Gly	Gly	Val 255	Ala
Ser	Ile	Ala	Gly 260	Arg	Tyr	Ile	Ala	Arg 265	Ala	Cys	Lys	Asp	Thr 270	Leu	Glu
Lys	Tyr	Ala 275	Leu	Ser	Ala	Ile	Leu 280	Ser	Asn	Thr	Arg	Gly 285	Val	Cys	Thr
Glu	Ala 290	Phe	Glu	Asn	Val	Val 295	Glu	Ala	Asn	Thr	Leu 300	Met	Ser	Gly	Leu
Gly 305	Phe	Glu	Asn	Gly	Gly 310	Leu	Ala	Ala	Ala	His 315	Ala	Ile	His	Asn	Gly 320
Met	Thr	Ala	Ile	His 325	Gly	Pro	Val	His	Arg 330	Leu	Met	His	Gly	Glu 335	Lys

Val Ala Tyr Gly Thr Leu Val Gln Val Val Leu Glu Asp Trp Pro Leu
 340 345 350

Glu Asp Phe Asn Asn Leu Ala Ser Phe Met Ala Lys Cys His Leu Pro
 355 360 365

Ile Thr Leu Glu Glu Leu Gly Ile Pro Asn Val Thr Asp Glu Glu Leu
 370 375 380

Leu Met Val Gly Arg Ala Thr Leu Arg Pro Asp Glu Ser Ile His Asn
 385 390 395 400

Met Ser Lys Lys Phe Asn Pro Ser Gln Ile Ala Asp Ala Ile Lys Ala
 405 410 415

Val Asp Ser Tyr Ser Gln Lys Trp Gln Glu Gln Thr Gly Trp Thr Glu
 420 425 430

Arg Phe Arg Leu Pro Pro Ser Arg His Ser Pro His Leu Thr Asp Ile
 435 440 445

His Pro
 450

<210> 14
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Primer

<400> 14
 aaaaaaacgc gtggtggtga cccatccata ac

32

<210> 15
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Primer

<400> 15
 ttttttctgc agatcgatgg cgcgaacaag

30

<210> 16
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Primer

<400> 16
 aaaaaagacg tcgaagagaa tcggactagg

30

<210> 17
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Primer

<400> 17
 ttttttgccg gcggatggag ggacaaatac

30

<210> 18
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Primer

<400> 18
 tggcggtagt cacaaggacg

20

<210> 19
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Primer

<400> 19
 agtgccgagg accgagaatc

20

<210> 20
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Primer

<400> 20
 aaaaaaacgc gtgtccctcc cacttacaac tc

32

<210> 21
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Primer

<400> 21
 ttttttggtg ccccggaacc catctggaaa tc

32

<210> 22
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 22

aaaaaaacta gttaggtcgc tggatgtcct ac

32

<210> 23

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 23

ttttttgccg gcaagtcggg catagaaggc

30

<210> 24

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 24

ggkgctaach tbgcymcmga r

21

<210> 25

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 25

dgtratbara tcr gcvacac c

21

<210> 26

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 26

krtygghycy ggtaactggg g

21

<210> 27

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 27

rtgraagtad ggtckgtgga a

21

<210> 28

<211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Primer

<400> 28
 ccattgccgg tgcactcaag aatgtcg

27

<210> 29
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Primer

<400> 29
 cgacattctt gagtgcaccg gcaatgg

27

<210> 30
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Primer

<400> 30
 ggctgctgga tttgtcgaag gtttagg

27

<210> 31
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Primer

<400> 31
 ccttgccitt acctctgaaa tgcgtccg

27

<210> 32
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Primer

<400> 32
 tccccggtcg accggaactt agcttactcg tc

32

<210> 33
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Primer

<400> 33
ttgcgaggat cctgagtgca gtagctgtac ac 32

<210> 34
<211> 706
<212> DNA
<213> Kluyveromyces thermotolerans

<400> 34
cactcgcaag ctgtgccatc gcccaacggt taattataag aaatcaacat cagccaacaa 60
ctattttcgt cccctcttt tcagtggtaa cgagcaatta cattagtaag agactatttt 120
cttcagtgat ttgtaatttt ttttcagtga ttgtaattc tttctcgaat tatgcgggct 180
waamtaatcc ggacattcac tacatgcaag gaaaaacgag aaccgcggag atttcctcag 240
taagtaacaa tgatgatctt ttacgcttc atcatcactt tccaaagttc taagctataa 300
gttcaagcct agatacgtg aaaaactcct gaccaacaat gtaaagaaaa caattacaat 360
tgtaagggtg aaaacatcta aaaatgaaat attttattgt acatgcacac cctgatagtc 420
attctcttac ttcacccctg aaagacgtgg ctgtacaaga gttggaatcg caaggtcatg 480
agggttaaagt tagtgatctt tatgtcctaa agtggaaggc ctcaatagac cgtgacgacw 540
wmaaaaaama aamrmaagaa gagagggttaa aaatacccca agcttcttat gaagcgtatg 600
ccagaggagc attaacaaaa gacgtaaadc aggaacagga aaaacttatt tgggcggact 660
ttgtcatttt gtcgtttcct atatggtggt cttctatgcc ggctag 706

<210> 35
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 35
tgtcagcatg cactcgcaag ctgtgccatc 30

<210> 36
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 36
aaccttgctg actagccggc atagaagacc acc 33

<210> 37
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 37
 tgtcaggatc cactcgcaag ctgtgccatc 30

<210> 38
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Primer

<400> 38
 aaccttcccg ggtagccggc atagaagacc acc 33

<210> 39
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Primer

<400> 39
 aaccaaagaa ttgttgctgc ttt 23

<210> 40
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Primer

<400> 40
 ttcgaaaaca cctggtggac cgttc 25

<210> 41
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Primer

<400> 41
 gcggtgaccc gggagatctg aattc 25

<210> 42
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Primer

<400> 42
 gaattcagat ct 12

<210> 43
 <211> 25
 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 43

gcggtgaccc gggagatctg aattc

25

<210> 44

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 44

ccaattctgc agcaactggc tttaacg

27

<210> 45

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 45

gcggtgaccc gggagatctg aattc

25

<210> 46

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 46

gcctcaccat ttggtctgcc c

21

<210> 47

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 47

gactcccgg agtgtcgaaa tatga

25

<210> 48

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 48

gtgatagcgg gtcctttcgc tacc

24

<210> 49
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Primer

<400> 49
 gcggtgaccc gggagatctg aattc

25

<210> 50
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Primer

<400> 50
 gaattcagat ct

12

<210> 51
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Primer

<400> 51
 gcgatctcga gatttgctgc aacggcaaca tcaatg

36

<210> 52
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Primer

<400> 52
 ctagcatctg attgttgctg tcgttgcttt tgcttt

36

<210> 53
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Primer

<400> 53
 gcgatctcga gatttgctgc aacggcaaca tcaatg

36

<210> 54
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Primer
 <400> 54
 acttgccat ggttggtgtt gttgtcgtt tttttg 36

<210> 55
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Primer
 <400> 55
 ccggaattcg atatctgggc wggkaatgcc aaygarttra atgc 44

<210> 56
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Primer
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(21)
 <223> n is a, c, g, or t
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (33)..(33)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 56
 cgcggattca ggcctcagta ngaraawgaa ccngtrttra artc 44

<210> 57
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Primer
 <400> 57
 actgtcgcgc tcagtatatg gaattgacgg ctcctc 36

<210> 58
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Primer
 <400> 58
 actgacgcgt cgacgtatca tttgtagccc acgccacc 38

<210> 59

<211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Primer

<400> 59
 cctcccccg gctgatagaa gggatgatg taatt

35

<210> 60
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Primer

<400> 60
 ccaagagtta tggggcccca gttg

24

<210> 61
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Primer

<400> 61
 gcgatctcga gatttgctgc aacggcaaca tcaatg

36

<210> 62
 <211> 69
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Primer

<400> 62
 tggactagta catgcatgcg gtgagaaagt agaaagcaaa cattgttggt gttgttgctg
 ttgtttttg

60

69

<210> 63
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Primer

<400> 63
 cctcccccg ggaatcaaaa gttatattat taatgattca ag

42

<210> 64
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 64

ggacgagagc tcgggcccac gacttcagag ttgattttga gtc

43

<210> 65

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 65

ggacatgcat gcgagctcaa tgcgtgacac cgccatgatg gttg

44

<210> 66

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 66

ggacatgcat gctacgtacc ctgcagggca ccaacagcaa caccacctg aa

52

<210> 67

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 67

ggacatgcat gcgagctcat agttgaacaa acactggcat ttg

43

<210> 68

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 68

ggacatgcat gctacgtacc ctgcaggtgt gtgcaactag gtttatgtgg ag

52

<210> 69

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 69

cctcccccg ggatatctag ttagatagct cctcctccaa tcgaattatt agc

53

<210> 70

<211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Primer

<400> 70
 ggacgagagc tcgggcccta cgtctatgta tcataaaattt gg

42

<210> 71
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> SEQ. ID. NO. 71

<400> 71
 aaaaaacata tggagatggt aatatgtggg tct

33

<210> 72
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Primer

<400> 72
 ttttttcttg caggtcagta ataacagtgg aga

33

<210> 73
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Primer

<400> 73
 aaaaaacccg ggggtgcctta tcaggtgcta

30

<210> 74
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Primer

<400> 74
 ttttttgaat tcaaggttgc agcatgacag

30

<210> 75
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Primer

<400> 75
 gagttcaccc gtccagatag

20

<210> 76
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Primer

<400> 76
 ggacaacgta catggacgat tc

22

<210> 77
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Primer

<400> 77
 ctatctggac gggatgaactc

20

<210> 78
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Primer

<400> 78
 ggactggggg tgtacaat

18

<210> 79
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Primer

<400> 79
 cttgtgcagg ctcagacttg

20

<210> 80
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Primer

<400> 80
 caaggcattc tggcagcttc

20

<210> 81
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 81

cggcttccaa agcggactta cc

22

<210> 82

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 82

aaggccgaca gccattcaa gg

22

<210> 83

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 83

gatacgtcga ccgcatctc gagcg

25

<210> 84

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 84

gttactagtg gtacagagaa cttgtaaaca attc

34

<210> 85

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 85

ggttatagcg gaaaacaccg ttgagag

27

<210> 86

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 86

ccgctagacc aacagtcac tag

23

<210> 87

<211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Primer

<400> 87
 cttctatagg ttgagaccct cgg

23

<210> 88
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Primer

<400> 88
 gtgccatata tctaccaact ctaacg

26

<210> 89
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Primer

<400> 89
 catatggaga tgttaatatg tgggtc

26

<210> 90
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Primer

<400> 90
 caagggttga gcatgacagc catcg

25

<210> 91
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Primer

<400> 91
 ggaccgatgg ctgtgtagaa

20

<210> 92
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Primer

<400> 92
acggcctcca gaagaagatg

REIVINDICAÇÕES

1. Célula de uma levedura de duplicação de genoma pré-total, **CARACTERIZADA** pelo fato de ser geneticamente modificada para suprimir ou interromper um caminho metabólico nativo a partir de diidroxí acetona fosfato para glicerol.

2. Célula, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de ser hemiascomicetosa.

3. Célula, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADA** pelo fato de quando cultivada na presença de uma fonte de carbono que pode ser metabolizada pela célula, metaboliza menos que 2% do peso de fonte de carbono que é consumida pela célula a glicérol.

4. Célula, de acordo com a reivindicação 3, **CARACTERIZADA** pelo fato de ser geneticamente modificada para produzir um ácido orgânico.

5. Célula, de acordo com a reivindicação 4, **CARACTERIZADA** pelo fato de conter um cassete de gene LDH funcional, e que produz lactato.

6. Célula, de acordo com a reivindicação 5, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a supressão ou interrupção do caminho metabólico nativo inclui uma supressão ou interrupção de pelo menos um gene glicérol-3-fosfato desidrogenase nativo.

7. Célula, de acordo com a reivindicação 5, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a supressão ou interrupção do caminho metabólico nativo inclui uma supressão ou interrupção de pelo menos um gene glicérol-3-fosfatase nativo.

8. Célula, de acordo com a reivindicação 5, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a supressão ou interrupção do caminho metabólico nativo inclui uma supressão ou interrupção de pelo menos um gene glicérol-3-fosfato desidrogenase nativo e de pelo menos um gene glicérol-3-fosfatase nativo.

9. Célula, de acordo com a reivindicação 5, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a supressão ou interrupção do caminho metabólico nativo inclui uma supressão ou interrupção de pelo menos um gene diidroxí acetona fosfatase nativo, uma supressão ou interrupção de um gene glicérol desidrogenase nativo, ou uma supressão ou interrupção de ambos um gene diidroxí acetona fosfatase nativo e um gene glicérol desidrogenase nativo.

10. Célula de acordo com qualquer uma das reivindicações 4-9, **CARACTERIZADA** pelo fato de conter uma supressão ou interrupção de um caminho metabólico nativo a partir de piruvato para etanol.

11. Célula dentro de *Zygosaccharomyces*, *Zygotorulaspóra*, *Torulaspóra*, *Lachancea*, *Kluyveromyces*, *Eremothecium* ou *Hanseniaspora* clades do complexo *Saccharomyces* (Kurtzman 2003), **CARACTERIZADA** pelo fato de ser geneticamente modificada para suprimir ou interromper um caminho metabólico nativo a partir de diidroxí acetona fosfato para glicérol.

12. Célula, de acordo com a reivindicação 12, **CARACTERIZADA** pelo fato de que quando cultivada na presença de uma fonte de carbono que pode ser metabolizada pela célula, metaboliza menos que 2% do peso de fonte de carbono que é consumido pela célula a glicerol.

5 13. Célula, de acordo com a reivindicação 12, **CARACTERIZADA** pelo fato de ser geneticamente modificada para produzir um ácido orgânico.

14. Célula, de acordo com a reivindicação 13, **CARACTERIZADA** pelo fato de conter um cassete de gene LDH funcional, e que produz lactato.

10 15. Célula, de acordo com a reivindicação 14, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a supressão ou interrupção do caminho metabólico nativo inclui uma supressão ou interrupção de pelo menos um gene glicerol-3-fosfato desidrogenase nativo.

16. Célula, de acordo com a reivindicação 14, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a supressão ou interrupção do caminho metabólico nativo inclui uma supressão ou interrupção de pelo menos um gene glicerol-3-fosfatase nativo.

15 17. Célula, de acordo com a reivindicação 14, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a supressão ou interrupção do caminho metabólico nativo inclui uma supressão ou interrupção de pelo menos um gene glicerol-3-fosfato desidrogenase nativo e de pelo menos um gene glicerol-3-fosfatase nativo.

20 18. Célula, de acordo com a reivindicação 14, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a supressão ou interrupção do caminho metabólico nativo inclui uma supressão ou interrupção de pelo menos um gene diidroxí acetona fosfatase nativo, uma supressão ou interrupção de um gene glicerol desidrogenase nativo, ou uma supressão ou interrupção de ambos um gene diidroxí acetona fosfatase nativo e um gene glicerol desidrogenase nativo.

25 19. Célula de acordo com qualquer uma das reivindicações 13-18, **CARACTERIZADA** pelo fato de conter uma supressão ou interrupção de um caminho metabólico nativo a partir de piruvato para etanol.

20. Célula dos gêneros Kluyveromyces, Candida ou Issatchenkia, **CARACTERIZADA** por ser geneticamente modificada para suprimir ou interromper um caminho metabólico nativo de diidroxí acetona fosfato para glicerol.

30 21. Célula, de acordo com a reivindicação 20, **CARACTERIZADA** pelo fato de que quando cultivada na presença de uma fonte de carbono que pode ser metabolizada pela célula, metaboliza menos que 2% do peso de fonte de carbono que é consumido pela célula a glicerol.

35 22. Célula, de acordo com a reivindicação 21, **CARACTERIZADA** pelo fato de ser geneticamente modificada para produzir um ácido orgânico.

23. Célula, de acordo com a reivindicação 22, **CARACTERIZADA** pelo fato de conter um cassete de gene LDH funcional, e que produz lactato.

24. Célula, de acordo com a reivindicação 23, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que a supressão ou interrupção do caminho metabólico nativo inclui uma supressão ou interrupção de pelo menos um gene glicerol-3-fosfato desidrogenase nativo.

5 25. Célula, de acordo com a reivindicação 23, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que a supressão ou interrupção do caminho metabólico nativo inclui uma supressão ou interrupção de um gene glicerol-3-fosfatase nativo.

26. Célula, de acordo com a reivindicação 23, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que a supressão ou interrupção do caminho metabólico nativo inclui uma supressão ou interrupção de pelo menos um gene glicerol-3-fosfato desidrogenase nativo e de pelo menos um
10 gene glicerol-3-fosfatase nativo.

27. Célula de acordo com qualquer uma das reivindicações 21-26, **CHARACTERIZADA** pelo fato de conter uma supressão ou interrupção de um caminho metabólico nativo a partir de piruvato para etanol.

28. Célula dentro de clade *I. orientalis* / *P. fermentans* (Kurtzman and Robnett 1998)
15 ou dentro de clade *Kluyveromyces* do complexo *Saccharomyces* (Kurtzman 2003), **CHARACTERIZADA** pelo fato de ser geneticamente modificada para suprimir ou interromper um caminho metabólico nativo a partir de diidroxacetona fosfato para glicerol.

29. Célula, de acordo com a reivindicação 28, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que quando cultivada na presença de uma fonte de carbono que pode ser metabolizada pela
20 célula, metaboliza menos que 2% do peso de fonte de carbono que é consumido pela célula a glicerol.

30. Célula, de acordo com a reivindicação 29, **CHARACTERIZADA** pelo fato de ser geneticamente modificada para produzir um ácido orgânico.

31. Célula, de acordo com a reivindicação 30, **CHARACTERIZADA** pelo fato de con-
25 ter um cassete de gene LDH funcional, e que produz lactato.

32. Célula, de acordo com a reivindicação 31, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que a supressão ou interrupção do caminho metabólico nativo inclui uma supressão ou interrupção de pelo menos um gene glicerol-3-fosfato desidrogenase nativo.

33. Célula, de acordo com a reivindicação 31, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que
30 a supressão ou interrupção do caminho metabólico nativo inclui uma supressão ou interrupção de pelo menos um gene glicerol-3-fosfatase nativo.

34. Célula, de acordo com a reivindicação 31, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que a supressão ou interrupção do caminho metabólico nativo inclui uma supressão ou interrupção de pelo menos um gene glicerol-3-fosfato desidrogenase nativo e de pelo menos um
35 gene glicerol-3-fosfatase nativo.

35. Célula, de acordo com a reivindicação 31, **CHARACTERIZADA** pelo fato de ser uma célula *K. marxianus*.

36. Célula, de acordo com a reivindicação 35, **CARACTERIZADA** pelo fato de conter uma supressão ou interrupção de um caminho metabólico nativo a partir de piruvato a etanol.

37. Célula, de acordo com a reivindicação 31, **CARACTERIZADA** pelo fato de ser uma célula de *I. orientalis*.

38. Célula, de acordo com a reivindicação 37, **CARACTERIZADA** pelo fato de conter uma supressão ou interrupção de um caminho metabólico nativo de piruvato para etanol.

39. Célula geneticamente modificada de uma espécie de levedura de duplicação de genoma pré-total, **CARACTERIZADA** pelo fato de produzir menos que 2,0 g/L de glicerol quando cultivada sob as seguintes condições micro-aeróbicas padrões:

A.meio aquoso definido contendo, no início de cultura, 5 g/L de sulfato de amônio, 3 g/L de diidrogeno fosfato de potássio, 0,5 g/L de sulfato de magnésio, elementos em traços, vitaminas, 150 g/L de glicose;

B.pH de 3,5 no início de cultura, com o meio de fermentação sendo tamponado se necessário para prevenir que o pH caia abaixo de 3,0 ou se eleve acima de 7,0 durante a cultura;

C.Cultura inoculada com a célula de levedura para uma OD₆₀₀ de 1,0;

D.Temperatura de cultura de 30°C;

E.Cultura é continuada até a concentração de glicose ser reduzida para 10 g/L, mas não é continuada por mais que 120 horas;

F.Aeração e agitação suficientes para produzir uma taxa de tomada de oxigênio de $5,0 \pm 1,0$ mmoles/L/h.

40. Célula, de acordo com a reivindicação 39, **CARACTERIZADA** pelo fato de ser hemiascomicetosa.

41. Célula, de acordo com a reivindicação 39, **CARACTERIZADA** pelo fato de que está dentro de clades *Zygosaccharomyces*, *Zygotorulaspora*, *Torulaspora*, *Lachancea*, *Kluyveromyces*, *eremothecium* ou *Hanseniaspora* do complexo *Saccharomyces* (Kurtzman 2003).

42. Célula, de acordo com a reivindicação 40, **CARACTERIZADA** pelo fato de que é do gênero *Kluyveromyces*, *candida* ou *Issatchenkia*.

43. Célula de acordo com qualquer uma das reivindicações 39-42, **CARACTERIZADA** pelo fato de produzir não mais que 0,6 g/L de glicerol quando cultivada sob as condições micro – aeróbicas padrões.

44. Célula, de acordo com a reivindicação 43, **CARACTERIZADA** pelo fato de produzir pelo menos 10 g/L de um desejado produto de fermentação quando cultivada sob as condições micro – aeróbicas padrões.

45. Célula geneticamente modificada de uma espécie de levedura de duplicação de

genoma pré-total, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a célula geneticamente modificada carece de habilidade para produzir uma enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase ativa que é nativamente produzida por células das espécies de levedura tipo selvagem.

5 46. Célula, de acordo com a reivindicação 45, **CARACTERIZADA** pelo fato de ser hemiascomicetosa.

47. Célula, de acordo com a reivindicação 45, **CARACTERIZADA** pelo fato de estar dentro de clades *Zygosaccharomyces*, *Zygorulasporea*, *Torulaspora*, *Lachancea*, *Kluyveromyces*, *Eremothecium*, ou *Hanseniaspora* do complexo *Saccharomyces* (Kurtzman 2003).

10 48. Célula, de acordo com a reivindicação 45, **CARACTERIZADA** pelo fato de ser dos gêneros *Kluyveromyces*, *Candida* ou *Issatchenkia*.

49. Célula de acordo com qualquer uma das reivindicações 44-48, **CARACTERIZADA** pelo fato de carecer de habilidade para produzir uma enzima glicerol-3-fosfatase ativa que é nativamente produzida por células das espécies de levedura.

15 50. Célula de uma espécie de levedura de duplicação de genoma pré-total, **CARACTERIZADA** por falta de habilidade para produzir uma enzima glicerol-3-fosfatase ativa que é nativamente produzida por células tipo selvagem das espécies de levedura.

51. Célula, de acordo com a reivindicação 50, **CARACTERIZADA** pelo fato de ser hemiascomicetosa.

20 52. Célula, de acordo com a reivindicação 50, **CARACTERIZADA** pelo fato de estar dentro de clades *Zygosaccharomyces*, *Zygorulasporea*, *Torulaspora*, *Lachancea*, *Kluyveromyces*, *Eremothecium*, ou *Hanseniaspora* do complexo *Saccharomyces* (Kurtzman 2003).

53. Célula, de acordo com a reivindicação 50, **CARACTERIZADA** pelo fato de ser dos gêneros *Kluyveromyces*, *Candida* ou *Issatchenkia*.

25 54. Célula geneticamente modificada de uma espécie de levedura, **CARACTERIZADA** pelo fato de ter falta de habilidade para produzir uma enzima diidroxí acetona fosfato fosfatase ativa que é nativamente produzida por células tipo selvagem das espécies de leveduras, carece de habilidade para produzir uma enzima glicerol desidrogenase dependente de NADH^+ ativa que é nativamente produzida por células tipo selvagem das espécies de leveduras, ou ambas.

30 55. Célula de levedura, **CARACTERIZADA** pelo fato de ser geneticamente modificada para produzir um produto ácido orgânico, a dita célula de levedura ainda tendo uma supressão ou interrupção de um caminho metabólico nativo de diidroxí acetona fosfato para glicerol e uma supressão ou interrupção de um caminho metabólico nativo de piruvato para etanol.

35 56. Célula de levedura, de acordo com a reivindicação 55, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a supressão ou interrupção do caminho metabólico nativo de diidroxí acetona fosfato para glicerol inclui uma supressão ou interrupção de pelo menos um gene glicerol-3-

fosfato desidrogenase nativo.

57. Célula de levedura, de acordo com a reivindicação 55, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que a supressão ou interrupção do caminho metabólico nativo de diidroxí acetona fosfato para glicerol inclui uma supressão ou interrupção de pelo menos um gene glicerol-3-fosfatase nativo.

58. Célula de levedura, de acordo com a reivindicação 55, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que a supressão ou interrupção do caminho metabólico nativo de diidroxí acetona fosfato para glicerol inclui uma supressão ou interrupção de pelo menos um gene glicerol-3-fosfato desidrogenase nativo e de pelo menos um gene glicerol-3-fosfatase nativo.

59. Célula de levedura, de acordo com a reivindicação 55, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que a supressão ou interrupção do caminho metabólico nativo de diidroxí acetona fosfato para glicerol inclui uma supressão ou interrupção de pelo menos um gene diidroxí acetona fosfato fosfatase nativo, uma supressão ou interrupção de um gene glicerol desidrogenase nativo, ou uma supressão ou interrupção de ambos um gene diidroxí acetona fosfato fosfatase nativo e um gene glicerol desidrogenase nativo.

60. Célula de levedura de acordo com qualquer uma das reivindicações 55-59, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que o ácido orgânico é lactato.

61. Processo de fermentação, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que uma célula de qualquer uma das reivindicações 1-3, 11-12, 20-21 ou 28-29 é cultivada sob condições de fermentação e na presença de uma fonte de carbono para produzir um desejado produto de fermentação, onde rendimento de glicerol é de menos que 2% baseado no peso da fonte de carbono que é consumida pela célula.

62. Processo de fermentação, de acordo com a reivindicação 61, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o desejado produto de fermentação é produzido em um rendimento de pelo menos 40% baseado no peso da fonte de carbono que é consumido pela célula.

63. Processo, de acordo com a reivindicação 62, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o rendimento de glicerol é menos que 0,5% baseado no peso da fonte de carbono que é consumido pela célula.

64. Processo, de acordo com a reivindicação 63, **CHARACTERIZADO** pelo fato de o desejado produto de fermentação é etanol.

65. Processo de fermentação **CHARACTERIZADO** pelo fato de que uma célula de qualquer uma das reivindicações 4, 13, 22 ou 30 é cultivada sob condições de fermentação e na presença de uma fonte de carbono para produzir pelo menos um ácido orgânico, onde o rendimento de glicerol é de menos que 2% baseado no peso da fonte de carbono que é consumido pela célula.

66. Processo de fermentação, de acordo com a reivindicação 66, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o ácido orgânico é produzido em um rendimento de pelo menos 40% baseado no peso da fonte de carbono que é consumido pela célula e o rendimento de glicerol é de menos que 0,5% baseado no peso da fonte de carbono que é consumido pela célula.

67. Processo de fermentação **CARACTERIZADO** pelo fato de que uma célula de qualquer uma das reivindicações 5-9, 14-18, 23-26, ou 31-38 é cultivada sob condições de fermentação e na presença de uma fonte de carbono para produzir lactato, onde o rendimento de glicerol é de menos que 2% baseado no peso da fonte de carbono que é consumido pela célula.

68. Processo de fermentação, de acordo com a reivindicação 67, **CARACTERIZADO** pelo fato de que lactato é produzido em um rendimento de pelo menos 40% baseado no peso da fonte de carbono que é consumido pela célula e o rendimento de glicerol é menos que 0,5% baseado no peso da fonte de carbono que é consumido pela célula.

69. Processo de fermentação **CARACTERIZADO** pelo fato de que uma célula de qualquer uma das reivindicações 1-3, 11-12, 20-21 ou 28-29 é cultivada sob condições de fermentação e na presença de uma fonte de carbono para produzir etanol, onde o rendimento de glicerol é menos que 2% baseado no peso de fonte de carbono que é consumido pela célula.

FIG. 1

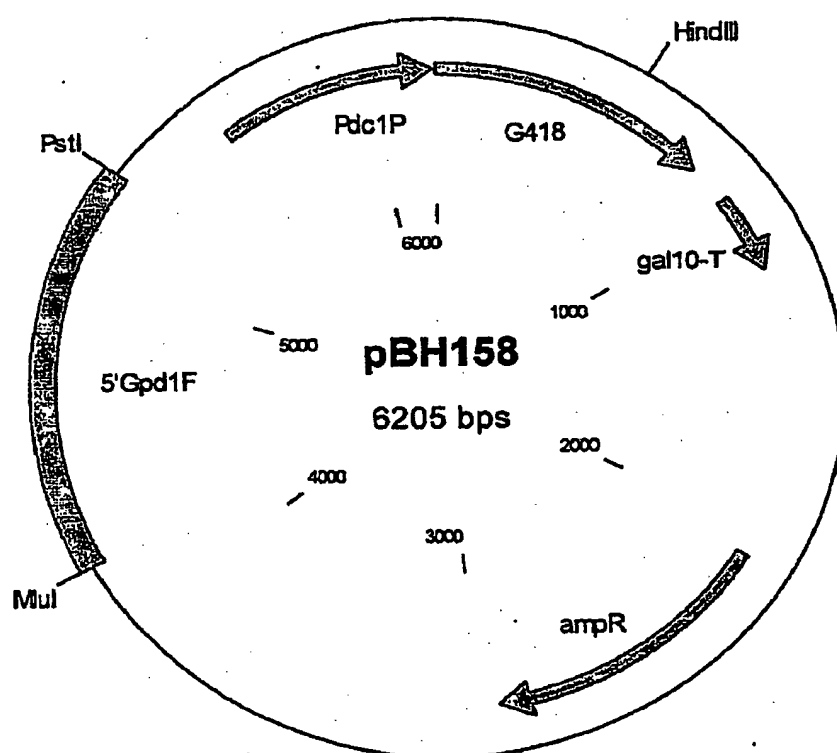


FIG. 2

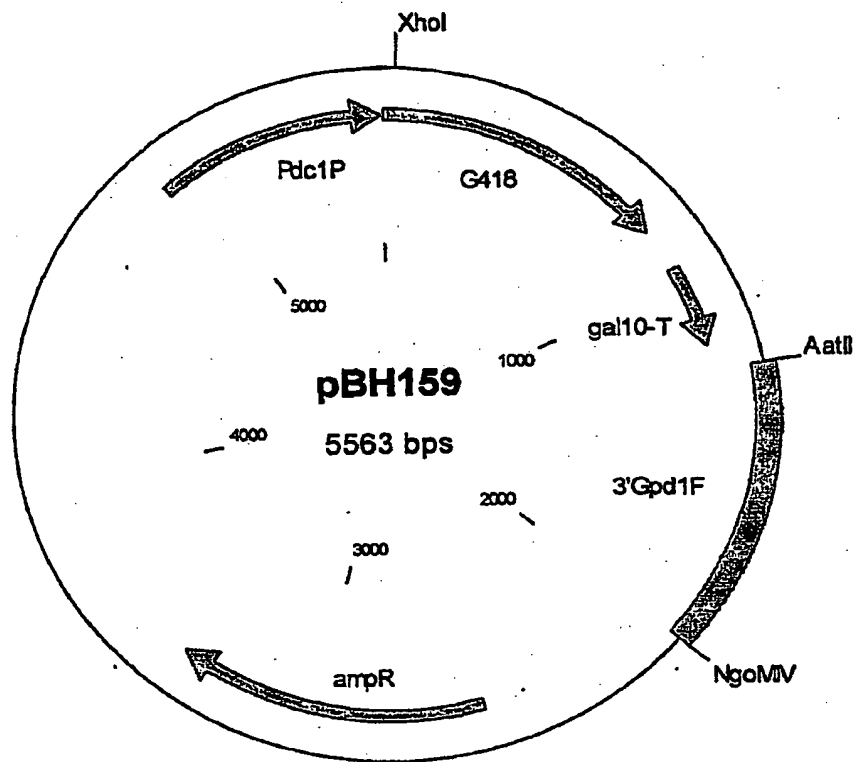


FIG. 3

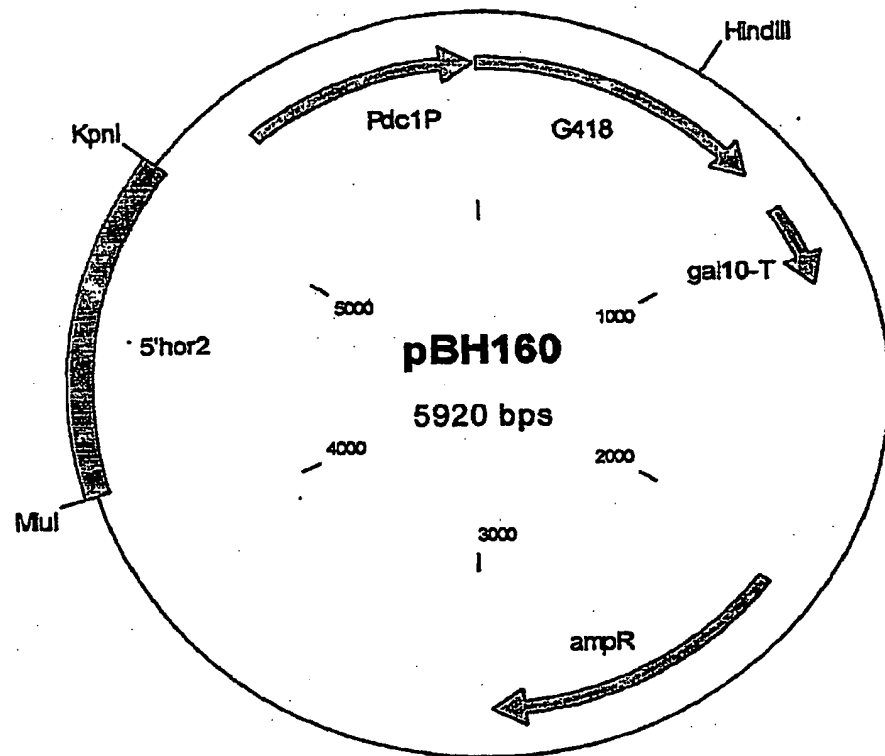


FIG. 4

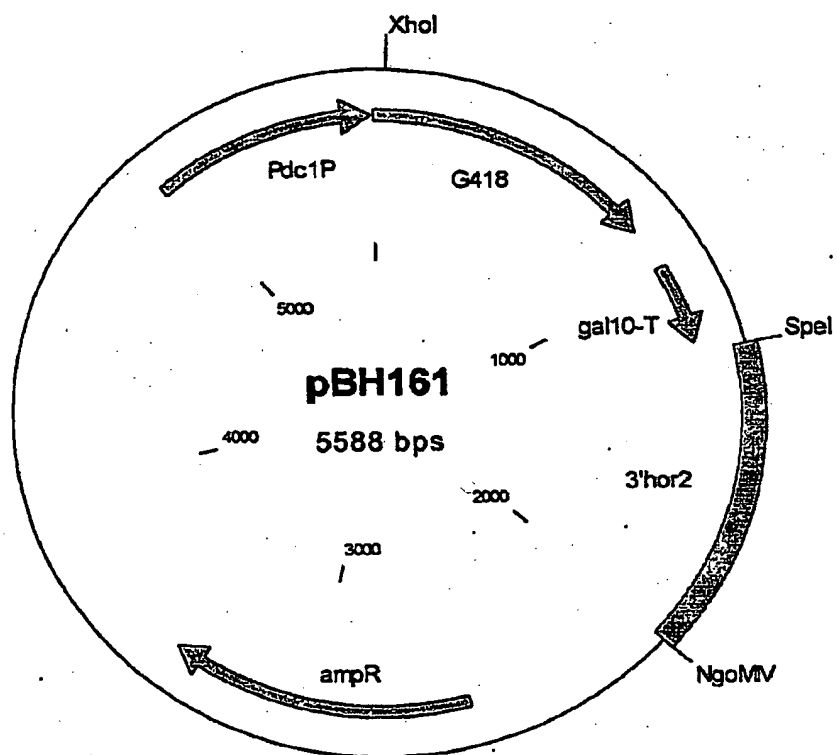


FIG. 5

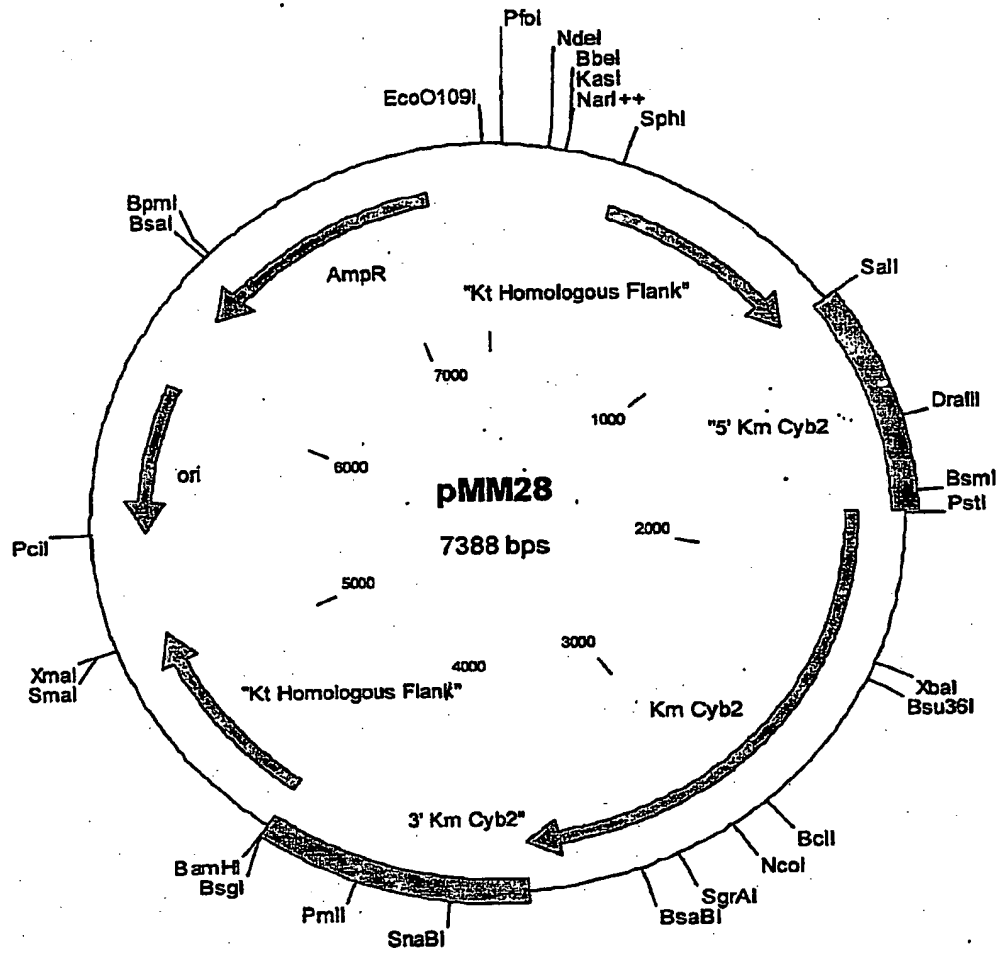


FIG. 6

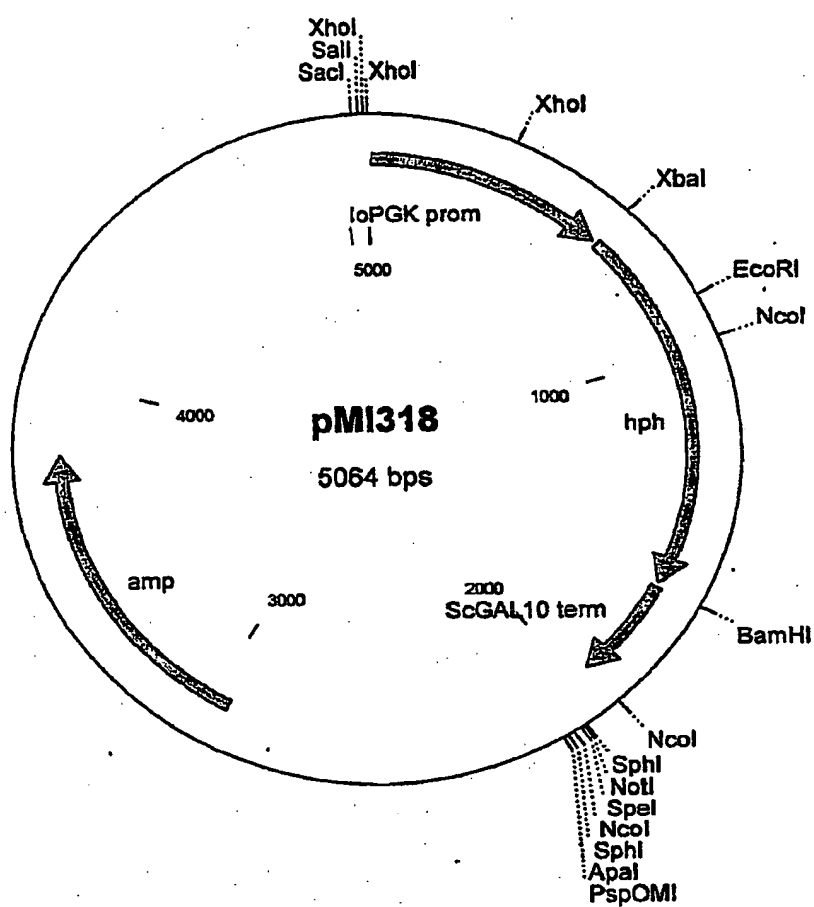


FIG. 7

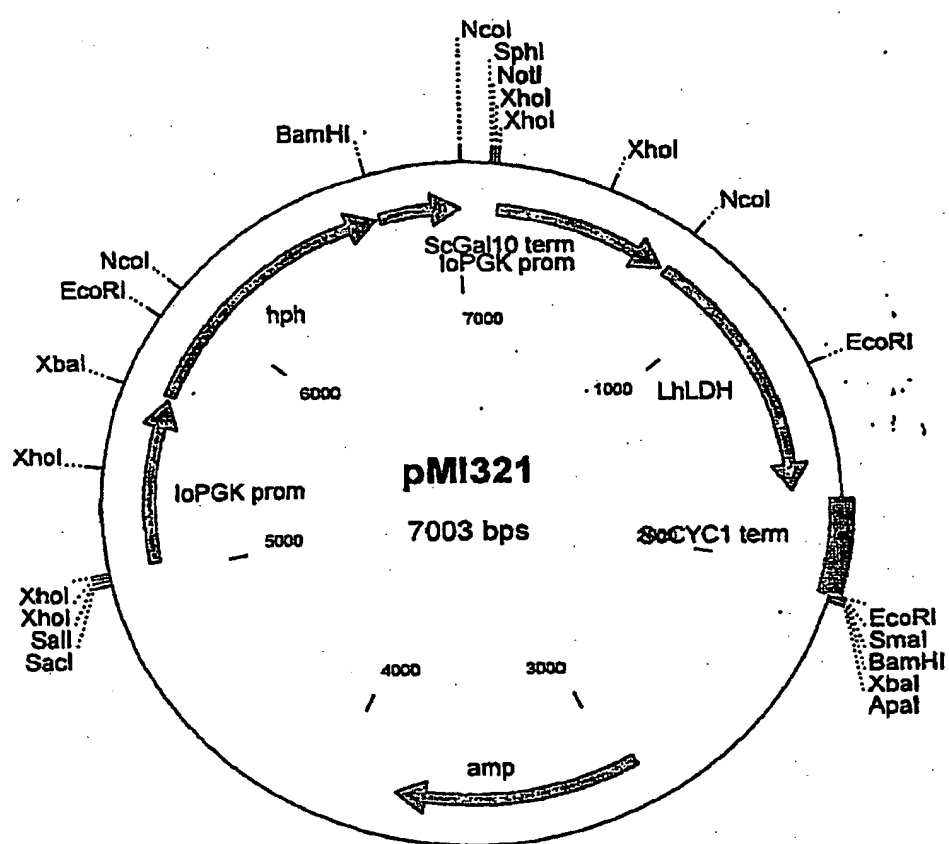


FIG. 8

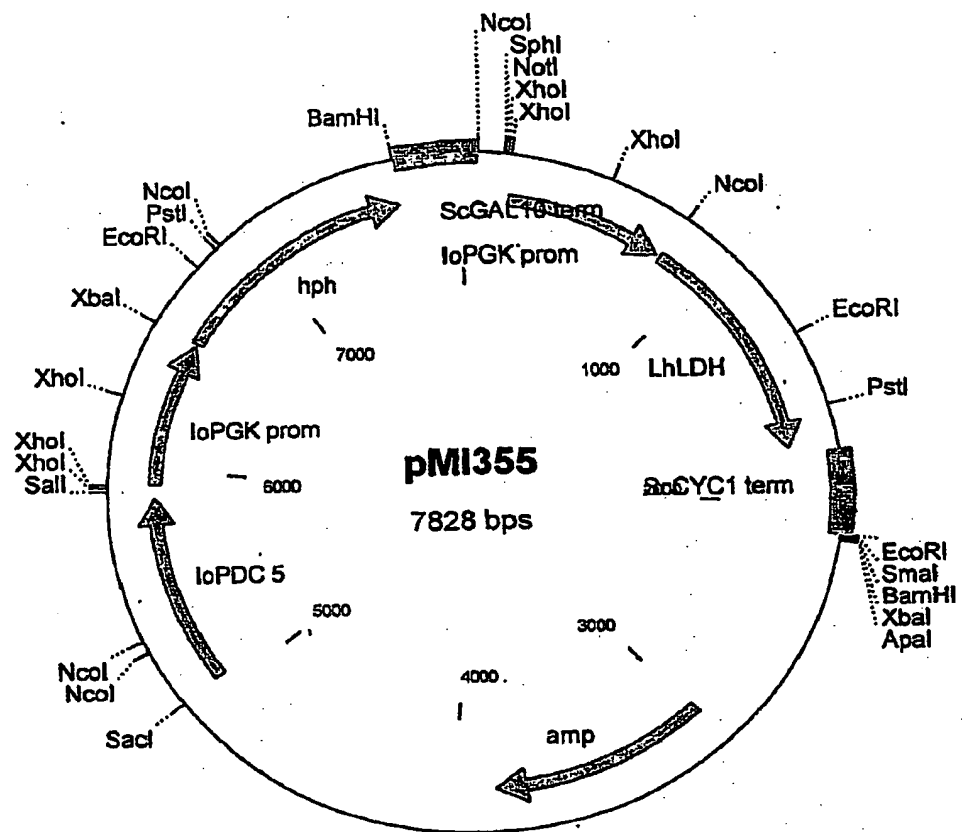


FIG. 9

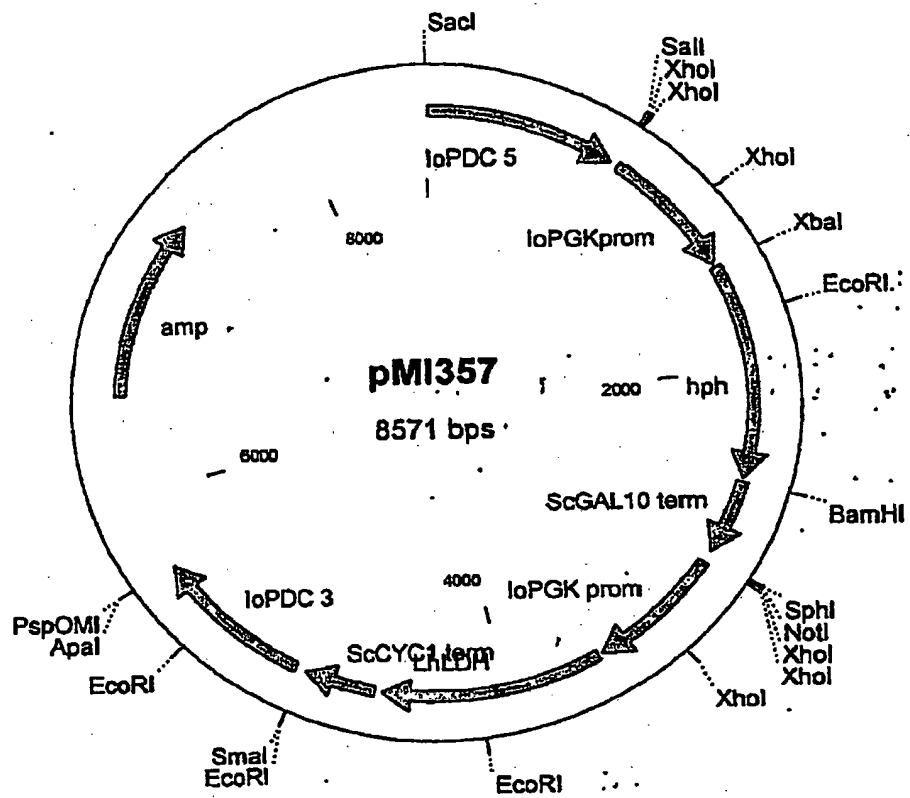


FIG. 10

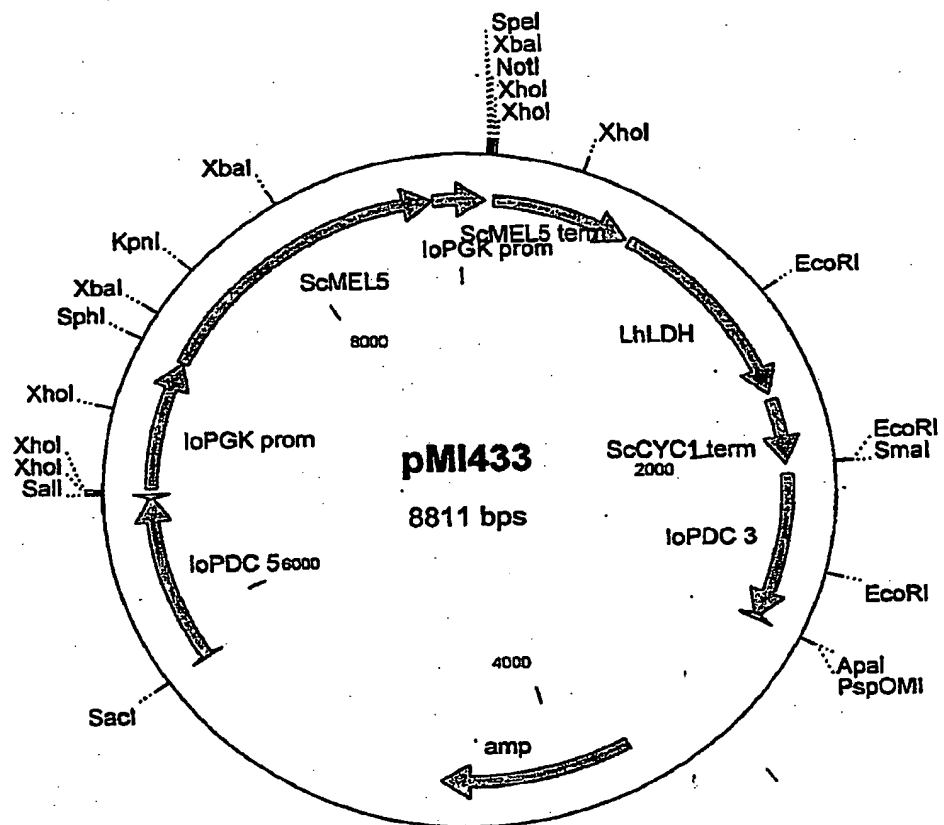


FIG. 11

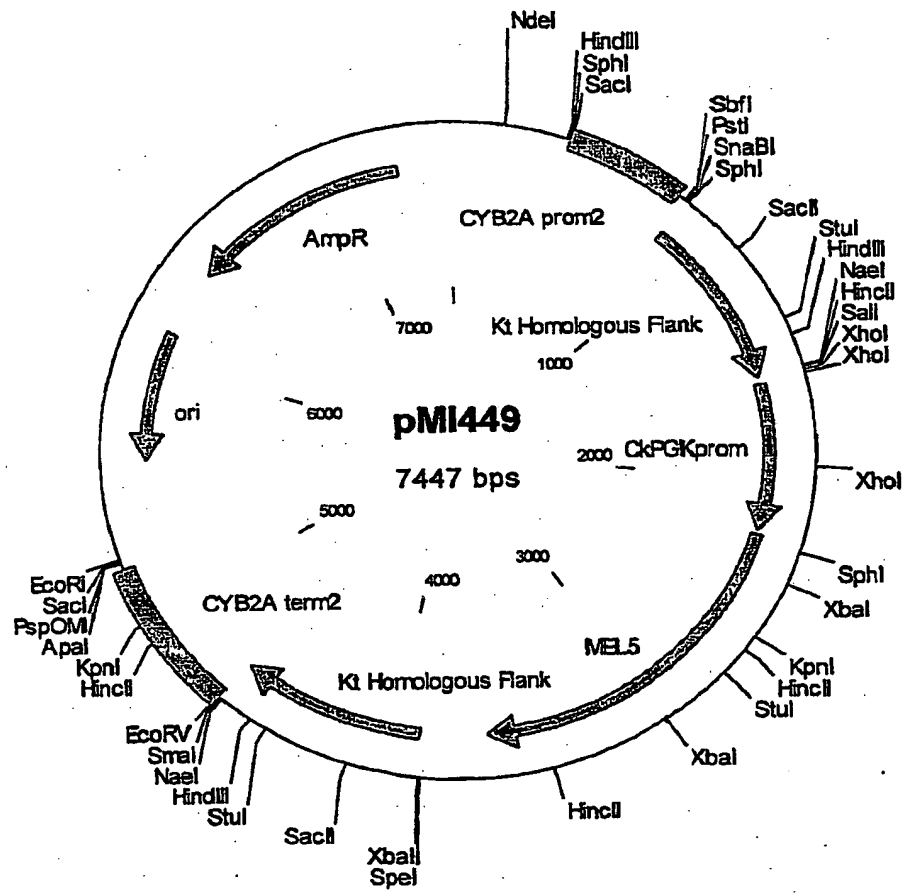


FIG. 12

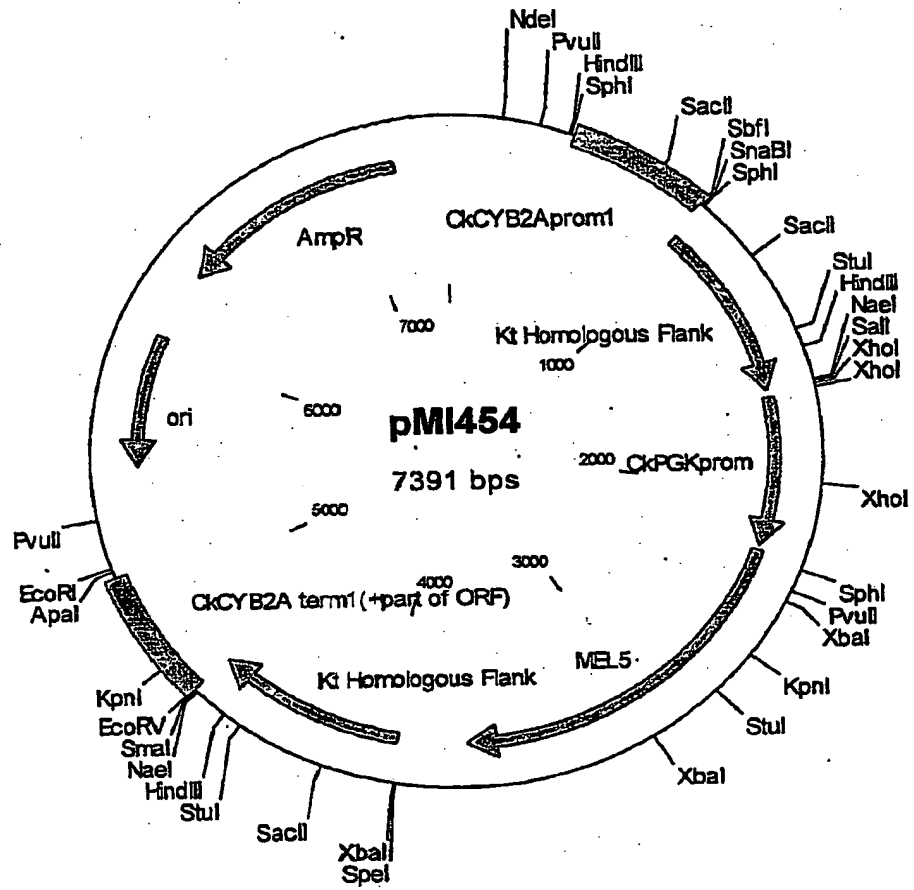


FIG. 13

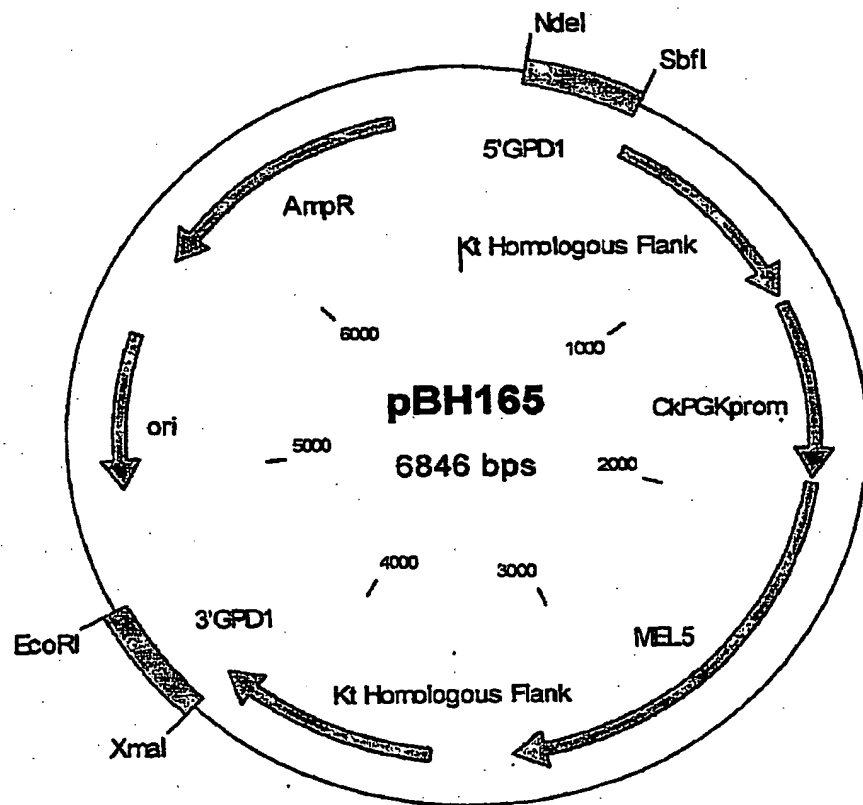
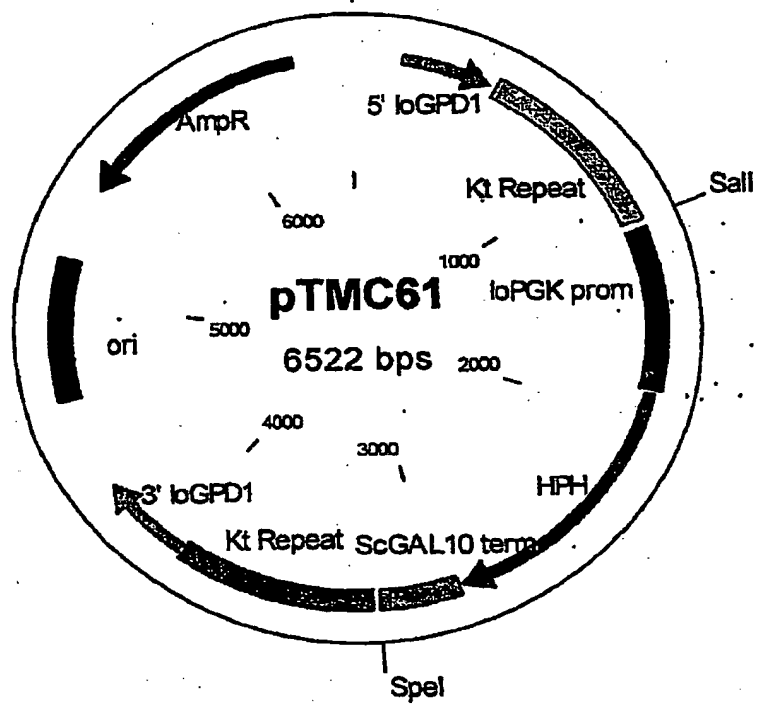


FIG. 14



RESUMO

PTD-9607-0

"CÉLULAS DE LEVEDURA TENDO CAMINHO INTERROMPIDO A PARTIR DE DIIDROXI ACETONA FOSFATO PARA GLICEROL"

- Células de levedura são geneticamente modificadas para interromper um caminho metabólico nativo a partir de diidroxí acetona para glicerol. Em certos aspectos, a célula de levedura é do gênero *Kluyveromyces Candida* ou *Issatchenkia*. Em outros aspectos, a célula de levedura é capaz de produzir pelo menos um ácido orgânico, tal como lactato. As células de levedura produzem significativamente menos glicerol que as linhagens tipo selvagem, e usualmente produzem maiores rendimentos de desejados produtos de fermentação. Células de levedura da invenção freqüentemente crescem bem quando cultivadas, à despeito de sua reduzida produção de glicerol.