



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112015011544-6 B1



(22) Data do Depósito: 20/11/2013

(45) Data de Concessão: 16/08/2022

(54) Título: MICRORGANISMO RECOMBINANTE, COMPOSIÇÃO COMPREENDENDO O MESMO, MÉTODO DE PRODUÇÃO DE ETANOL E CO-CULTURA

(51) Int.Cl.: C12N 9/04; C12N 9/02; C12N 9/10; C12N 9/88; C12P 7/06.

(30) Prioridade Unionista: 15/03/2013 US 61/792,731; 20/11/2012 US 61/728,450.

(73) Titular(es): LALLEMAND HUNGARY LIQUIDITY MANAGEMENT LLC.

(72) Inventor(es): ARTHUR J. SHAW IV; AARON ARGYROS; TRISHA BARRETT.

(86) Pedido PCT: PCT US2013070964 de 20/11/2013

(87) Publicação PCT: WO 2014/081803 de 30/05/2014

(85) Data do Início da Fase Nacional: 19/05/2015

(57) Resumo: MICRORGANISMO RECOMBINANTE, COMPOSIÇÃO, MÉTODOS DE PRODUÇÃO DE UM PRODUTO DA FERMENTAÇÃO EMPREGANDO A DITA COMPOSIÇÃO, DE PRODUÇÃO DE ETANOL, DE REDUÇÃO DE PRODUÇÃO DE GLICEROL E CO-CULTURA. A presente invenção refere-se a fornecer um mecanismo para substituir completamente a função aceitando o elétron de formação de glicerol com um modo alternativo para a formação de etanol, desse modo, reduzindo a produção de glicerol e aumentando a produção de etanol. Em algumas modalidades, a invenção fornece um microrganismo recombinante compreendendo uma sub-regulagem em uma ou mais enzimas nativas no modo de produção de glicerol. Em algumas modalidades, a invenção fornece um microrganismo recombinante compreendendo uma super-regulagem em uma ou mais enzimas no modo de produção de etanol.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
**"MICRORGANISMO RECOMBINANTE, COMPOSIÇÃO
COMPREENDENDO O MESMO, MÉTODO DE PRODUÇÃO DE
ETANOL E CO-CULTURA".**

Referência para a Listagem de Sequência

[0001] A presente invenção se refere ao teor da listagem de sequência eletronicamente submetida ("2608.069PC02_PCTSequenceListing_ascii.txt", 356.130 bytes, criada em 19 de novembro de 2013) depositada com o pedido é incorporado aqui por referência em sua totalidade.

Antecedentes da Invenção

[0002] Conversão de energia, utilização e acesso sustentam muitas dos grandes desafios do nosso tempo, incluindo aqueles associados com a sustentabilidade, qualidade ambiental, segurança, e qualidade de vida. Novas aplicações de tecnologias emergentes são necessárias para responder a estes desafios. A biotecnologia, uma das mais poderosas das tecnologias emergentes, pode dar origem a importantes novos processos de conversão de energia. A biomassa de vegetal e seus derivados são um recurso para a conversão biológica de energia em formas úteis de humanidade.

[0003] Entre as formas de biomassa de vegetal, tanto biomassa com base em cereal quanto a biomassa lignocelulósica (coletivamente "biomassa") são bem adequadas para aplicações de energia. Cada matéria-prima de alimentação tem as vantagens e desvantagens. Por exemplo, por causa de sua disponibilidade em larga escala, baixo custo e biomassa lignocelulósica de produção ambientalmente benigna ela tem ganhado atenção como uma fonte de alimentação viável para produção de biocombustível. Em particular, muita produção de energia e ciclos de utilização com base na biomassa celulósica têm quase zero de emissões de gás de estufa em uma base no ciclo de vida.

[0004] De qualquer modo, as matérias-primas de alimentação com base em cereais são mais facilmente convertidas em combustíveis por meio dos micro-organismos existentes, se bem que matéria-prima de alimentação com base em cereal é mais caro do que a matéria-prima de alimentação lignocelulósica e conversão para combustíveis que competem com os usos alternativos para o grão.

[0005] Os esquemas de processamento da biomassa envolvendo hidrólise enzimática ou microbiana geralmente envolvem quatro transformações biologicamente mediadas: (1) a produção de enzimas sacarolíticas (celulases e hemicelulases); (2) a hidrólise dos componentes de carboidrato presentes na biomassa pré-tratada de açúcares; (3) a fermentação dos açúcares de hexoses (*por exemplo*, glicose, manose e galactose); e (4) a fermentação dos açúcares de pentoses (*por exemplo*, xilose e arabinose). Estas quatro transformações podem ocorrer em uma etapa única em uma configuração do processo chamada bioprocessamento consolidado ("CBP"), que é distinta das outras configurações menos altamente integradas em que não envolve uma etapa do processo dedicado para produção de celulase e/ ou hemicelulase.

[0006] O CBP oferece o potencial para custo inferior e maior eficiência do que os processos caracterizando a produção celulase dedicada. Os benefícios resultam em parte aos custos de capital evitados, substratos e outras matérias-primas, e utilitários associados com a produção de celulase. Além disso, vários fatores suportam a realização de taxas maiores de hidrólise, e em consequência volume reduzido do reator e investimento de capital empregando CBP, incluindo sinergia enzima-micróbio e o uso de organismos termofílicos e/ ou sistemas complexos de celulase. Além do mais, microrganismos celulolíticos aderentes à celulose provavelmente competem de forma bem-sucedida por produtos de hidrólise da celulose com micróbios não

aderidos, *por exemplo*, contaminantes. A competição bem-sucedida dos micróbios desejáveis aumenta a estabilidade dos processos industrial com base na utilização de celulose microbiana. O progresso no desenvolvimento de microrganismos permitindo o CBP é sendo feito através de duas estratégias: engenheirar microrganismos celulolíticos de ocorrência natural para melhorar as propriedades relacionada ao produto, tais como, rendimento e título; e engenheirar organismos não celulolíticos que apresentam elevados rendimentos do produto e título para expressar uma celulase heteróloga e sistema de hemicelulase permitindo a utilização de celulose e hemicelulose.

[0007] Uma forma de atender a demanda de produção de etanol é para converter os açúcares encontrados na biomassa, *isto é*, materiais, tais como, resíduos agrícolas, casacas de milho, espigas de milho, materiais celulósicos, e assim por diante para produz o etanol. A eficiente conversão da biomassa nas aplicações industriais em larga escala requerem um microrganismo que é capaz de tolerar altas concentrações de açúcar e etanol, e que é capaz de fermentar mais do que um açúcar simultaneamente.

[0008] O fermento de padaria (*Saccharomyces cerevisiae*) é o microrganismo preferido para a produção de etanol (Hahn-Hägerdal, B., e outros *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 73: 53–84 (2001)). Os modos para a produção de etanol em *S. cerevisiae* podem ser vistos nas Figuras de 1 a 3. Os atributos em favor deste micróbio são (i) de alta produtividade perto dos rendimentos teóricos (0,51 g por etanol produzido/ g de glicose empregado), (ii) elevada tolerância osmo- e etanol, (iii) robustez natural nos processos industriais, e também (iv) sendo, de modo geral, considerado como seguro (GRAS) devido a sua longa associação com vinho e panificação, e produção de cerveja. Além disso, *S. cerevisiae* apresenta tolerância aos inibidores geralmente encontrados nos hidrolisados resultante de pré-tratamento de

biomassa. Os modos metabólicos exemplares para a produção de etanol são representados nas Figuras de 1 a 4.

[0009] De qualquer modo, glicerol é um produto final metabólico necessário de fermentação etanólica de levedura nativa (Figura 5A). Durante o crescimento anaeróbico nos carboidratos, a produção de etanol e de dióxido de carbono é a redox neutra, ao mesmo tempo que as reações que criam a biomassa da célula e dióxido de carbono associado são mais oxidadas em relação aos carboidratos. A produção de glicerol, a qual é mais reduzida em relação aos carboidratos, funciona como um dissipador de elétron para o deslocamento da formação da biomassa da célula, a fim de que a neutralidade global da redox é conservada. Isto é essencial a partir de uma consideração teórica de conservação de massa, e na prática as cepas incapazes de produzir glicerol são incapazes (ou apenas muito mal capazes) de crescer sob condições anaeróbicas.

[00010] Existe um forte incentivo comercial de não produzir glicerol, como representa a perda de produção de etanol. Nas fermentações industriais de etanol de milho, esta perda de produção pode ser de até 6 % do valor teórico, para um mercado de ~14 bilhões de galões/ ano. No preço de venda de \$2,50/ gal, este é um valor de mercado total de \$2 B/ ano.

[00011] As estratégias da literatura de resolver este problema incluem a diminuição da formação de glicerol por meio da técnica de fixação de amônia para funcionar com NADH em vez de NADPH através de regulação positiva de GLN1, codificando a glutamina sintetase, ou GLT1, codificando a glutamato sintase com a deleção de GDH1, codificando a glutamato desidrogenase dependente de NADPH. (Nissen, T.L., e *outros Metabolic Engineering 2*: 69-77 (2000)). Outra estratégia de engenharia de células para produzir excesso de NADPH durante a glicólise através da expressão de uma gliceraldeído-3-fosfato

desidrogenase ligada a NADPH. (Bro, C., e outros *Metabolic Engineering 8*: 102-111 (2006)).

[00012] De qualquer modo, as maiores estratégias de redução de glicerol ou somente parcialmente reduzem a necessidade de formação de glicerol, ou criam um subproduto diferente de etanol. A presente invenção supera as desvantagens destas outras estratégias por redirecionar os elétrons tipicamente colocados no glicerol na formação de etanol, desse modo, reduzindo a produção de glicerol e aumentando a produção de etanol (Figura 5B, Figura 6).

Breve Sumário da Invenção

[00013] Os aspectos da invenção são direcionados a um microrganismo recombinante compreendendo um ácido nucleico heterólogo codificando uma fosfoctolase; pelo menos um ácido nucleico heterólogo codificando uma enzima em uma via de produção de acetil CoA; um ácido nucleico heterólogo codificando uma acetaldéido-álcool desidrogenase bifuncional; e, pelo menos uma modificação genética que leva à regulação negativa de uma enzima em uma via de produção de glicerol. Em algumas modalidades, a fosfoctolase é uma fosfoctolase de especificidade única com o Número de Comissão de Enzima 4.1.2.9. Em algumas modalidades, a fosfoctolase é a fosfoctolase de especificidade dual com o Número de Comissão de Enzima 4.1.2.22. Os aspectos da invenção são direcionados a um microrganismo recombinante compreendendo pelo menos um ácido nucleico heterólogo codificando uma enzima em uma via de produção de acetil CoA; um ácido nucleico heterólogo codificando uma acetaldéido-álcool desidrogenase bifuncional; e, opcionalmente, pelo menos uma modificação genética que leva à regulação negativa de uma enzima em uma via de produção de glicerol. Em algumas modalidades, a enzima na via de produção de acetil CoA é fosfoctansacetilase com o Número de Comissão de Enzima 2.3.1.8. Em

algumas modalidades, a enzima na via de produção de acetil CoA é acetato quinase com o Número de Comissão de Enzima 2.7.2.12. Em algumas modalidades, a acetaldeído-álcool desidrogenase bifuncional é selecionado a partir de um grupo de enzimas tendo ambas os Números de Comissão de Enzima que seguem: EC 1.2.1.10 e 1.1.1.1. Em algumas modalidades, a acetaldeído-álcool desidrogenase bifuncional é uma acetaldeído-álcool desidrogenase bifuncional dependente de NADPH selecionada a partir de um grupo de enzimas tendo os Números de Comissão de Enzima que seguem: EC 1.2.1.10 e 1.1.1.2. Em algumas modalidades, a enzima na via de produção de glicerol é glicerol-3-fosfato desidrogenase com o Número de Comissão de Enzima 1.1.1.8. Em algumas modalidades, a enzima na via de produção de glicerol é glicerol-3-fosfato fosfatase com o Número de Comissão de Enzima 3.1.3.21.

[00014] Em algumas modalidades, o microrganismo também compreende pelo menos uma enzima regulada positivamente adicional. Em algumas modalidades, a transaldolase com o Número de Comissão de Enzima 2.2.1.2 é regulada positivamente. Em algumas modalidades, transcetolase com o Número de Comissão de Enzima 2.2.1.1 é regulada positivamente. Em algumas modalidades, ribose-5-P isomerase com o Número de Comissão de Enzima 5.3.1.6 é regulada positivamente. Em algumas modalidades, ribulose-5-P 3-epimerase com o Número de Comissão de Enzima 5.1.3.1 é regulada positivamente.

[00015] Em algumas modalidades, pelo menos uma enzima em um modo de glicólise é regulada positivamente no microrganismo. Em algumas modalidades, a enzima na via da glicólise é piruvato descarboxilase com o Número de Comissão de Enzima 4.1.1.1. Em algumas modalidades, a enzima na via da glicólise é álcool desidrogenase selecionada a partir de um grupo de enzimas tendo os Números de Comissão de Enzima que seguem: 1.1.1.1 e 1.1.1.2.

[00016] Em algumas modalidades, o microrganismo adicionalmente compreende pelo menos uma modificação genética que leva à regulação negativa de aldeído desidrogenase selecionado a partir de um grupo de enzimas tendo os Números de Comissão de Enzima que seguem: 1.2.1.3, 1.2.1.4 and 1.2.1.10. Em algumas modalidades, o microrganismo adicionalmente compreende pelo menos uma modificação genética que leva à regulação positiva de aldeído desidrogenase selecionado a partir de um grupo de enzimas tendo os Números de Comissão de Enzima que seguem: 1.2.1.3, 1.2.1.4 e 1.2.1.10. Em algumas modalidades, a aldeído desidrogenase é acetaldeído desidrogenase.

[00017] Em algumas modalidades, o microrganismo adicionalmente compreende pelo menos uma modificação genética que leva à regulação negativa de formiato desidrogenase selecionada a partir de um grupo de enzimas tendo os Números de Comissão de Enzima que seguem: 1.2.1.43 and 1.2.1.2.

[00018] Em algumas modalidades, o microrganismo adicionalmente compreende pelo menos uma modificação genética que leva à regulação positiva da piruvato formiato liase com o Número de Comissão de Enzima 2.3.1.54. Em algumas modalidades, o microrganismo adicionalmente compreende pelo menos uma modificação genética que leva à regulação positiva da enzima ativadora da piruvato formiato liase com o Número de Comissão de Enzima 1.97.1.4.

[00019] Em algumas modalidades, o microrganismo é levedura. Em algumas modalidades, o microrganismo é do gênero *Saccharomyces*. Em algumas modalidades, o microrganismo é *Saccharomyces cerevisiae*.

[00020] Em algumas modalidades, os microrganismos recombinantes descritos aqui para produzir etanol com um rendimento

mais elevado do que um microrganismo de outra forma idêntico sem as referidas modificações genéticas. Em algumas modalidades, o microrganismo produz um título de etanol 1%-10% mais do que um microrganismo de outra forma idêntico sem as referidas modificações genéticas.

[00021] Em algumas modalidades, os microrganismos recombinantes descritos aqui produzem glicerol em um rendimento mais baixo do que um microrganismo de outra forma idêntico sem as referidas modificações genéticas. Em algumas modalidades, o microrganismo produz um título de glicerol de 10 a 100 % menos do que um microrganismo de outra forma idêntico sem as referidas modificações genéticas.

[00022] Em algumas modalidades, a invenção é direcionada às células hospedeiras descritas aqui e uma matéria-prima de alimentação contendo carbono. Em algumas modalidades, a matéria-prima de alimentação é selecionada a partir do grupo consistindo em biomassa lenhosa, capins, resíduos de processamento de açúcar, resíduos urbanos, resíduos agrícolas ou qualquer combinação destes. Em algumas modalidades, a matéria-prima de alimentação compreende fibra de polpa de madeira reciclada, serragem, madeira de lei, madeira macia, palha de arroz, cascas de arroz, palha de cevada, sabugos de milho, palha de cereal, palha de trigo, palha de canola, palha de aveia, cascas de aveia, fibra de milho, palha, suculentas, agave, bagaço de cana, gramínea, miscanto, lodo de papel, resíduos urbanos ou qualquer combinação destes.

[00023] Em algumas modalidades, a invenção é direcionada a um método de produção de um produto da fermentação empregando uma composição descrita aqui, em que a célula hospedeira da composição é capaz de fermentar a matéria-prima de alimentação contendo o carbono para produzir o produto da fermentação.

[00024] Em algumas modalidades, a invenção é direcionada a um método de produção de etanol compreendendo fornecer qualquer célula hospedeira descrita aqui; cultivando a célula hospedeira na presença de uma matéria-prima de alimentação contendo carbono durante o tempo suficiente para produzir o etanol; e, opcionalmente, extrair o etanol.

[00025] Em algumas modalidades, a invenção é direcionada a um método de redução de produção de glicerol compreendendo o fornecimento de qualquer célula hospedeira descrita aqui, em que a referida produção de glicerol é de 10 a 100 % menos do que um microrganismo de outra forma idêntico sem as referidas modificações genéticas. Em algumas modalidades, a produção de glicerol da célula hospedeira é reduzida quando comparada a um microrganismo de outra forma idêntico sem as referidas modificações genéticas, e em que o título de etanol aumentou de pelo menos 1 a 10 % quando a célula hospedeira é cultivada na presença de uma matéria-prima de alimentação contendo carbono durante um tempo suficiente para produzir o etanol.

[00026] Em algumas modalidades, a invenção é direcionada a uma co-cultura compreendendo pelo menos duas células hospedeiras em que uma das células hospedeiras compreende uma célula hospedeira descrita aqui e outra célula hospedeira que é geneticamente diferente da célula hospedeira da invenção. Em algumas modalidades, a célula hospedeira geneticamente diferente da co-cultura é uma levedura ou bactéria. Em algumas modalidades, a célula hospedeira geneticamente diferente é qualquer organismo do gênero *Saccharomyces*, *Issatchenkia*, *Pichia*, *Clavispora*, *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Trichoderma*, *Thermoascus*, *Escherichia*, *Clostridium*, *Caldicellulosiruptor*, *Zymomonas*, *Thermoanaerobacter* e *Thermoanaerobacterium*.

Breve Descrição dos Desenhos/ Figuras

[00027] A Figura 1 representa um modo metabólico simplificado de glicose em etanol utilizando fosfocetolase de especificidade. Os nomes das enzimas catalisando as etapas aplicáveis à invenção estão apresentados em itálico.

[00028] A Figura 2 representa um modo metabólico simplificado de glicose em etanol utilizando fosfocetolase de especificidade dual. Os nomes das enzimas catalisando as etapas aplicáveis à invenção estão apresentados em itálico.

[00029] A Figura 3 representa um modo metabólico simplificado de glicose em etanol que não utiliza fosfocetolase. Os nomes das enzimas catalisando as etapas aplicáveis à invenção estão apresentados em itálico.

[00030] A Figura 4 representa conversões alternativas de acetil-fosfato ("Acetil-P") em etanol.

[00031] A Figura 5 representa (A) modos de redox e carbono simplificado utilizados por *S. cerevisiae* do tipo selvagem durante o crescimento anaeróbico. A formação de etanol é a redox neutra ao mesmo tempo que a formação da biomassa da célula gera NADH líquido, que é equilibrado por meio da formação de glicerol; e (B) *S. cerevisiae* planejada com os equilíbrios do modo PHK-PTA-ADHE NADH gerado durante a formação da biomassa da célula com a produção de etanol.

[00032] A Figura 6 representa mecanismos pelos quais a formação de glicerol pode ser deletada ou regulada negativamente no contexto da via metabólica global.

[00033] A Figura 7 representa as interconversões metabólicas equivalentes empregando especificidade única e fosfocetolase de especificidade dual.

[00034] A Figura 8 representa um diagrama esquemático para construção por PCR e integração de KT-MX e cassetes de integração

NT-MX em ambas as cópias de cada cromossoma em um determinado sítio alvo. (A) A montagem de PCR transformada contém quatro produtos de PCR, um flanco 5' (p1) que é homólogo às sequências a montante do sítio alvo, cassete KT-MX (p2), cassete NT-MX (p3), e um flanco 3' (p4) homólogo às sequências a jusante do sítio alvo. Cada componente é amplificado individualmente empregando os iniciadores que criam as extensões sobrepostas homólogas de cada produto da PCR. A extensão das linhas tracejadas representam a homologia entre os cassetes NT-MX/ KT e o flanco 5' e a extensão das linhas sólidas representa a homologia com o flanco 3'. (B) A esquemática do cromossoma após a substituição do sítio alvo com KT-MX e NT-MX.

[00035] A Figura 9 representa um diagrama esquemático da estratégia empregada para substituir cassetes de seleção de NT-MX e KT-MX integrados, com uma "Montagem Mascoma" em ambos os cromossomas em um sítio alvo. Uma Montagem Mascoma ("MA") é empregada para identificar uma série de produtos da PCR sobrepostos que forma a construção desejada uma vez que são recombinados no organismo. Neste documento um número de MA é dado para representar uma combinação de componentes moleculares a serem montados através de recombinação. (A) A Montagem de Mascoma transformada contém uma quantidade de produtos da PCR que é dependente do evento da técnica desejado (pX), um flanco 5' (p1) que é homólogo às sequências a montante do sítio alvo, e um flanco 3' (p4) homólogo às sequências a jusante do sítio alvo. Cada componente é amplificado individualmente empregando os iniciadores que criam extensões sobrepostas homólogas. As linhas de extensão sobrepostas representam a homologia no final daqueles produtos da PCR. (B) Diagrama esquemático do cromossoma seguindo a seleção no FUDR e substituição dos mercados genéticos com a Montagem Mascoma.

[00036] A Figura 10 representa os esquemas de integração para PTA

de *B. adolescentis* e (A) PHK de *B. adolescentis*, (B) PHK1 de *L. plantarum*, e (C) PHK de *A. niger* no local de FCY1 de *S. cerevisiae*.

[00037] A Figura 11 representa a taxa melhorada de crescimento anaeróbico de cepas de *S. cerevisiae* contendo a PTA integrada e PHK, M4008, M4409, e M4410 comparada a uma cepa que não contém M3293, PHK e PTA integrada.

[00038] A Figura 12 representa a taxa de crescimento aeróbico das cepas de *S. cerevisiae* contendo a PTA integrada e PHK, M4008, M4409, e M4410 em comparação a uma cepa que não contém M3293, PHK e PTA integrada.

[00039] A Figura 13 representa a produção de etanol das cepas de *S. cerevisiae* contendo a PTA integrada e PHK, M4008, M4409, e M4410 em comparação a uma cepa que não contém M3293, PHK e PTA integrada, para fermentação empregando 31 % de sólidos de puré de milho. M2390 é um controle do tipo selvagem.

[00040] A Figura 14 representa a produção de ácido acético em cepas de *S. cerevisiae* contendo a PTA integrada e PHK, M4008, M4409, e M4410 em comparação a uma cepa que não contém M3293, PHK e PTA integrada, durante a fermentação empregando 31 % de sólidos de puré de milho. M2390 é um controle do tipo selvagem.

[00041] A Figura 15 representa o crescimento melhorado nas cepas de *S. cerevisiae* contendo a PTA integrada e PHK, M4008, M4409, e M4410 em comparação a uma cepa que não contém M3293, PHK e PTA integrada, durante a fermentação em meio definido. M2390 é um controle do tipo selvagem.

[00042] A Figura 16 representa a produção de etanol no meio definido de cepas de *S. cerevisiae* contendo a PTA integrada e PHK, M4008, M4409, e M4410 em comparação a uma cepa que não contém M3293, PHK e PTA integrada, durante a fermentação no meio definido. M2390 é um controle do tipo selvagem.

[00043] A Figura 17 representa a produção de glicerol no meio definido de cepas de *S. cerevisiae* contendo a PTA integrada e PHK, M4008, M4409, e M4410 em comparação a uma cepa que não contém M3293, PHK e PTA integrada, durante a fermentação em meio definido. M2390 é um controle do tipo selvagem.

[00044] A Figura 18 representa um plasmídeo de expressão de PHK1 de *L. plantarum*.

[00045] A Figura 19 representa um plasmídeo de expressão de PHK2 de *L. plantarum*.

[00046] A Figura 20 representa um plasmídeo de expressão de PHK de *A. niger*.

[00047] A Figura 21 representa um plasmídeo de expressão de PHK de *L. casei*.

[00048] A Figura 22 representa um plasmídeo de expressão de PHK de *N. crassa*.

[00049] A Figura 23 representa um plasmídeo de expressão de PHK de *B. adolescentis*.

[00050] A Figura 24 representa um plasmídeo de expressão de PTA de *B. adolescentis*.

[00051] A Figura 25 representa a produção de etanol de cepas de *S. cerevisiae* M4408, M4579, M4581, M4582, M4584, M4788, M4789, M4790, M4791, M4792, M4793, M4794, e M4795 que contém os componentes do modo em um antecedente de M3293.

[00052] A Figura 26 representa um diagrama esquemático do cassete de inserção MA0281.

[00053] A Figura 27 representa um diagrama esquemático do cassete de inserção MA0449.2.

[00054] A Figura 28 representa um diagrama esquemático do cassete de inserção MA0449.3.

[00055] A Figura 29 representa um diagrama esquemático do

cassete de inserção MA0449.1.

[00056] A Figura 30 representa um diagrama esquemático do cassete de inserção MA0467.6.

[00057] A Figura 31 representa um diagrama esquemático do cassete de inserção MA0435.1.

[00058] A Figura 32 representa um diagrama esquemático do cassete de inserção MA0415.4.

[00059] A Figura 33 representa um diagrama esquemático do cassete de inserção MA0415.3.

[00060] A Figura 34 representa um diagrama esquemático do cassete de inserção MA0434.6.

Breve Descrição da Invenção

Definições

[00061] A não ser que definido de outra forma, todos os termos técnicos e científicos empregados aqui têm o mesmo significado como geralmente entendido por alguém de ordinária versatilidade na técnica da técnica metabólica microbiana. Se bem que os métodos e os materiais semelhantes ou equivalentes àqueles descritos aqui podem ser empregados na prática dos métodos e composições, métodos exemplares, dispositivos e materiais descritos são descritos aqui.

[00062] As modalidades descritas, e referências na especificação para "uma modalidade", "uma modalidade", "um exemplo de modalidade", etc., indicam que as modalidades descritas podem incluir um aspecto, estrutura, ou característica específica, mas cada modalidade não necessariamente inclui aspecto, estrutura, ou característica específica. Além do mais, tais frases não são necessariamente se referindo à mesma modalidade. Além disso, quando um determinado recurso, estrutura, ou característica é descrita em ligação com uma modalidade, entende-se que está dentro do conhecimento de um especialista na técnica para efetuar tais recurso,

estrutura, ou em ligação com característica de outras modalidades se ou não explicitamente descritos.

[00063] A descrição de "uma" ou "um" produto aqui pode se referir a um único item ou vários itens. Entende-se que, sempre que modalidades são aqui descritos com o idioma "compreendendo", modalidades de outra forma análogos descritos em termos de "consistindo de" e/ou "consistindo essencialmente em" também são fornecidos. Assim, por exemplo, a referência a "um polinucleotídeo" inclui uma pluralidade de tais polinucleotídeos e referência ao "microrganismo" inclui referência a um ou mais microrganismos, e assim por diante.

[00064] O termo "heterólogo" é utilizado em referência a um polinucleotídeo ou a um gene normalmente não encontrado no organismo hospedeiro. "Heterólogo" inclui genes endógenos regulados positiva ou negativamente. "Heterólogo" também inclui uma região de codificação nativa, ou uma sua porção, que é reintroduzido no organismo fonte de uma forma que é diferente do gene nativo correspondente, *por exemplo*, não na sua localização natural no genoma do organismo. "Heterólogo" também inclui qualquer gene que tenha sido modificado e colocado em um organismo. Um gene heterólogo pode incluir uma região de codificação nativa, que é uma porção de um gene quimérico incluindo uma região reguladora não nativo que é reintroduzido no hospedeiro nativo ou modificações às sequências reguladoras nativas que afetam o nível de expressão do gene. Os genes estranhos podem compreender genes nativos inseridos em um organismo não nativo, ou genes quiméricos. Um polinucleotídeo heterólogo, gene, polipeptídeo, ou uma enzima pode ser derivado ou isolado a partir de qualquer fonte, *por exemplo*, eucariotas, procariontes, vírus, ou fragmentos de polinucleotídeos sintéticos, e inclui regulação positiva de genes endógenos.

[00065] Os termos "gene (s)" ou "polinucleotídeo", ou "ácido nucleico" ou "sequência (s) polinucleotídica" destinam-se a incluir moléculas de ácido nucleico, *por exemplo*, polinucleotídeos que incluem uma grelha de leitura aberta que codifica para um polipeptídeo, e pode ainda incluir sequências não codificantes e reguladoras, íntrons. Além disso, os termos se destinam a incluir um ou mais genes que mapeiam para um locus funcional. Além disso, os termos se destinam a incluir um gene específico para um fim escolhido. O gene pode ser endógeno à célula hospedeira ou pode ser de forma recombinante introduzido na célula hospedeira, *por exemplo*, como um plasmídeo mantido episomicamente ou um plasmídeo (ou seu fragmento) que é integrado de forma estável no genoma. Em adição à forma de plasmídeo, um gene pode, *por exemplo*, estar na forma de DNA linear ou RNA. O termo "gene" destina-se também a cobrir várias cópias de um determinado gene, *por exemplo*, todas as sequências de DNA de uma célula que codificam um produto de gene em particular.

[00066] O termo "expressão" destina-se a incluir a expressão de um gene, pelo menos, ao nível da produção de mRNA, em geral subsequentemente traduzido para um produto proteico.

[00067] Tal como aqui utilizado, um "vetor de expressão" é um vetor capaz de dirigir a expressão de genes aos quais está ligado operacionalmente.

[00068] Em algumas modalidades, os microrganismos contêm enzimas envolvidas na digestão de celulose, o metabolismo e/ou hidrólise. Uma "enzima celulolítica" pode ser qualquer enzima envolvida na digestão de celulose, o metabolismo, e/ou hidrólise. O termo "celulase" se refere a uma classe de enzimas produzidas principalmente por fungos, bactérias e protozoários que catalisam celulólise (isto é, a hidrólise) de celulose. No entanto, também são as celulases produzidas por outros tipos de organismos, tais como plantas e animais. Vários

tipos diferentes de celulases são conhecidos, os quais diferem estruturalmente e mecanicamente. Existem tipos gerais de celulases com base no tipo de reação catalisada: endocelulase quebra as ligações internas para desestabilizar a estrutura cristalina da celulose e expõem cadeias de polissacarídeos de celulose individuais; exocelulase cliva de 2 a 4 unidades a partir das extremidades expostas das cadeias produzidas por endocelulase, resultando nos tetrassacarídeos ou dissacarídeo, tais como celobiose. Existem dois tipos principais de exocelulases (ou celobioidrolases, abreviadas CBH) - um tipo trabalhando processivamente a partir da extremidade redutora e um tipo trabalhando processivamente a partir da extremidade não redutora de celulose; celobiase ou beta-glicosidase hidrolisa o produto exocelulase em monossacarídeos individuais; celulases oxidativas que despolimerizam celulose por reações de radicais, como por exemplo, celobiose-desidrogenase (aceptor); celulose fosforilases que despolimerizam celulose usando fosfatos em vez de água. No caso mais conhecido de atividade de celulase, o complexo enzima decompõe celulose para beta-glicose. Uma "celulase" pode ser qualquer enzima envolvida na digestão de celulose, o metabolismo e/ou hidrólise, incluindo, por exemplo, uma endoglucanase, glicosidase, celobiohidrolase, xilanase, glucanase, xilosidase, xilano esterase, arabinofuranosidase, galactosidase, celobiose-fosforilase, fosforilase celodextrina, mananase, manosidase, xiloglucanase, endoxilanase, glucuronidase, acetilxilanesterase, arabinofuranoidrolase, swollenin, glucuronil-esterase, expansina, pectinases, e proteína feruoíla esterase.

[00069] Um "plasmídeo" ou "vetor" se refere a um elemento extracromossômico frequentemente transportar um ou mais genes, e é geralmente na forma de uma molécula de DNA de cadeia dupla circular. Os plasmídeos e vetores também podem conter elementos genéticos adicionais, tais como sequências de replicação autónoma, integração

de sequências do genoma do fago, ou sequências de nucleotídeos. Eles também podem ser linear, circular, superenrolado ou, de um DNA ou RNA de fita simples ou fita dupla, derivados de qualquer fonte. Os plasmídeos e vetores podem ser construídos por meio de técnicas conhecidas em que uma série de sequências de nucleotídeos foi unida ou recombinada em uma única construção. Os plasmídeos e vetores geralmente incluem também um fragmento do promotor e a sequência de DNA para um produto de gene selecionado, juntamente com a apropriada sequência 3' não traduzida. De um modo geral, os plasmídeos da presente invenção são estáveis e autorreplicante.

[00070] Tal como aqui utilizado, o termo "anaeróbico" se refere a um organismo, reação bioquímica ou processo que é ativa ou ocorre sob condições de ausência de O₂ gasoso.

[00071] As "condições anaeróbicas" são definidas como condições em que a concentração de oxigênio no meio de fermentação é muito baixa para o microrganismo a ser usado como um acceptor terminal de elétrons. Condições anaeróbicas podem ser conseguidas por aspensão de um meio de fermentação com um gás inerte, tal como nitrogênio, oxigênio até que já não está disponível para o microrganismo como um acceptor terminal de elétrons. Alternativamente, condições anaeróbicas podem ser conseguidas pelo microrganismo consumindo o oxigênio disponível de fermentação até oxigênio não estar disponível para o microrganismo como um acceptor terminal de elétrons.

[00072] O "metabolismo aeróbico" se refere a um processo bioquímico em que o oxigênio é utilizado como um acceptor terminal de elétrons para converter a energia, normalmente na forma de ATP, de hidratos de carbono. O metabolismo aeróbico tipicamente ocorre, por exemplo, através da cadeia de transporte de elétrons das mitocôndrias em eucariotas, em que uma única molécula de glicose é metabolizada completamente em dióxido de carbono na presença de oxigênio.

[00073] Em contraste, "metabolismo anaeróbico" se refere a um processo bioquímico em que o oxigênio não é o último aceptor de elétrons gerados. Metabolismo anaeróbico pode ser dividido em respiração anaeróbica, em que outros compostos de oxigênio servem como aceptor terminal de elétrons, e nível de fosforilação do substrato, na qual aceptor não exógeno de elétrons é utilizado e os produtos de um estado de oxidação intermediária são gerados através de uma "via fermentativa".

[00074] Nos "caminhos" de fermentação, a quantidade de NAD (P) H é gerada pela glicólise em relação ao consumo da mesma quantidade de NAD (P) H em etapas subsequentes. Por exemplo, em uma das vias de fermentação de determinadas cepas de levedura, NAD (P) H gerado através da glicólise doa seus elétrons para o acetaldeído, produzindo etanol. Vias fermentativas são normalmente ativas sob condições anaeróbicas, mas também podem ocorrer sob condições aeróbicas, sob condições em que o NADH não está totalmente oxidado através da cadeia respiratória.

[00075] Tal como aqui utilizado, o termo "produto final" se refere a um composto químico que não é, ou não pode ser utilizado por uma célula, e por isso é excretado ou permitido difundir-se no ambiente extracelular. Os exemplos mais comuns de produtos finais da fermentação anaeróbica incluem, mas não estão limitados a etanol, ácido acético, ácido fórmico, ácido láctico, hidrogênio e dióxido de carbono.

[00076] Tal como aqui utilizado, "cofatores" são compostos envolvidos em reações bioquímicas que são reciclados no interior das células e mantêm, aproximadamente, os níveis de estado estacionário. Exemplos comuns de cofatores envolvidos na fermentação anaeróbica incluem, mas não estão limitados a NAD^+ e NADP^+ . Em metabolismo, um cofator pode atuar em reações de oxidação-redução de aceitar ou

doar elétrons. Quando os compostos orgânicos são decompostos por oxidação no metabolismo, a energia pode ser transferida para o NAD^+ pela sua redução em NADH , NADP^+ a pela sua redução para NADPH , ou para um outro cofator, FAD^+ , pela sua redução para FADH_2 . Os cofatores redução podem então ser usados como um substrato para uma redutase.

[00077] Tal como aqui utilizado, um "percurso" é um grupo de reações bioquímicas que em conjunto podem converter um composto noutro composto, em um processo etapa a etapa. Um produto da primeira etapa de uma via pode ser um substrato para a segunda etapa, e um produto da segunda etapa pode ser um substrato para a terceira, e assim por diante. Acessos da presente invenção incluem, mas não estão limitados a via de metabolismo do piruvato, na via de produção de lactato, a via de produção de etanol, e a via de produção de glicerol.

[00078] O termo "recombinação" ou "recombinante" se refere à troca física de DNA entre duas moléculas de DNA idênticas (homóloga), ou, quase idênticas. A recombinação pode ser utilizada para a deleção do gene-alvo ou para modificar a sequência de um gene. O termo "microrganismo recombinante" e "célula hospedeira recombinante" são aqui utilizados indiferentemente e referem-se a microrganismos que tenham sido geneticamente modificados para expressar ou superexpressar polinucleotídeos endógenos, ou expressar polinucleotídeos heterólogos, tais como os incluídos em um vetor, ou que tem uma modificação na expressão de um gene endógeno.

[00079] Por "modificação de expressão" entende-se que a expressão do gene, ou o nível de uma molécula de RNA ou moléculas de RNA equivalentes que codificam um ou mais polipeptídeos ou subunidades polipeptídicas, ou atividade de um ou mais polipeptídeos ou subunidades polipeptídicas são regulados para cima ou regulados para baixo, de tal modo que a expressão, do nível, ou a atividade, seja maior

do que ou menor do que a observada na ausência da modificação.

[00080] Em um aspecto da invenção, os genes ou sequências polinucleotídicas específicas são parcial, substancial ou completamente suprimidas, silenciadas, inativadas, ou reguladas para baixo, a fim de inativar a atividade enzimática que eles codificam. Deleções Completas para proporcionar estabilidade máxima porque não há oportunidade para uma mutação inversa para restaurar a função. Alternativamente, os genes podem ser parcial, substancial ou completamente suprimida, silenciados, inativados, ou regulados negativamente por inserção, deleção, substituição ou remoção de sequências de ácidos nucleicos que interrompem a função e/ou expressão do gene.

[00081] Tal como aqui utilizado, o termo "regulação negativa" inclui a deleção ou mutação de uma sequência genética, ou a inserção de um elemento genético, codifica interromper ou não codificante, de tal modo que a produção de um produto de gene é diminuída pela deleção, mutação, ou de inserção. Ele inclui uma diminuição no nível de expressão (ou seja, a quantidade molecular) de um mRNA ou proteína. "Suprimir" ou "deleção" como aqui utilizado se refere a uma remoção de um elemento genético de tal modo que um gene correspondente está completamente impedido de ser expressa. Em algumas modalidades, se refere a uma supressão completa eliminação do gene. A regulação negativa pode também ocorrer, fazendo com que a repressão de elementos genéticos por meios químicos ambientais ou outros, por exemplo, por engenharia um elemento promotor quimicamente sensível (ou outro tipo de promotor condicional) para controlar a expressão de um produto genético desejado. A regulação negativa também pode ocorrer através da utilização de um promotor fraco.

[00082] Tal como aqui utilizado, o termo "regular positivamente" inclui a inserção, a reintrodução, mutação, ou o aumento da expressão de uma sequência genética, de tal modo que a produção de um produto

gênico é aumentada através da inserção, a reintrodução, ou mutação. "Inserir" ou "inserção" tal como aqui utilizado se refere a uma introdução de um elemento genético de tal modo que um gene correspondente é expresso. A regulação positiva pode também ocorrer, fazendo com que o aumento da expressão de elementos genéticos através de uma alteração da sequência reguladora associada.

[00083] Tal como aqui utilizado, o termo "via de glicerol-produção" se refere à coleção das vias bioquímicas que produzem glicerol a partir de DHAP. Os componentes da via consistem em todos os substratos, cofatores, derivados, intermediários, os produtos finais, e enzimas na via.

[00084] Tal como aqui utilizado, o termo "via de produção de etanol" se refere a coleção de vias bioquímicas que produzem etanol a partir do piruvato. Os componentes da via consistem em todos os substratos, cofatores, derivados, intermediários, os produtos finais, e enzimas na via.

[00085] Tal como aqui utilizado, o termo "via de produção de acetil-CoA" se refere à coleção de vias bioquímicas que produzem acetil-CoA a partir de acetil-fosfato. Os componentes da via consistem em todos os substratos, cofatores, derivados, intermediários, os produtos finais, e enzimas na via.

[00086] Tal como aqui utilizado, o termo "via de metabolismo do piruvato" se refere à coleção das vias bioquímicas que convertem piruvato em todo o produto, incluindo, mas não se limitando a, etanol, ácido láctico, ácido acético e formato. Também inclui a coleção de vias que resultam na produção de piruvato, tais como glicólise. Os componentes da via consistem em todos os substratos, cofatores, derivados, intermediários, os produtos finais, e enzimas na via.

[00087] Tal como aqui utilizado, o termo "glicólise" ou "via glicolítica" se refere à via canônica do metabolismo de base em que um açúcar, tal

como glicose é dividido em produtos mais oxidados, convertendo a energia e os compostos necessários para o crescimento celular. Os componentes da via consistem em todos os substratos, cofatores, seus derivados e produtos finais de produtos intermediários, e as enzimas na via.

[00088] Tal como aqui utilizado, o termo "fosfocetolase", "fosfocetolase de especificidade única" ou "fosfocetolase de especificidade dupla" destina-se a incluir as enzimas que catalisam a conversão de D-xilulose 5-fosfato para D-gliceraldeído-3-fosfato. Fosfocetolase de dupla especificidade inclui adicionalmente as enzimas que catalisam a conversão de D-frutose-6-fosfato para D-eritrose 4-fosfato. Fosfocetolase, fosfocetolase de especificidade única e fosfocetolase de especificidade dupla são referidas coletivamente como "PHKS" ou " fosfocetolase " (Figura 7). PHKS incluem as enzimas que correspondem à enzima "Comissão Number (CE) 4.1.2.9 e 4.1.2.22. Em algumas modalidades, é PHK de *A. niger* (SEQ ID NOs: 3 e 13), de *N. crassa* (SEQ ID NOS: 4 e 14), PHK de *L. casei* (SEQ ID NOs: 5 e 11), PHK1 de *L. plantarum* (SEQ ID NOs: 7 e 9), PHK2 de *L. plantarum* (SEQ ID NOs: 6 e 15), *B. adolescentis* (SEQ ID NOs: 8 e 12), *B. bifidum* (SEQ ID NOs: 61 e 62) , *B. Gallicum* (SEQ ID NOs: 63 e 64), *B. animalis* (SEQ ID NOs: 65 e 66), *L. pentosum* (SEQ ID NOs: 67 e 68), *L. acidophilus* (SEQ ID NOs: 69 e 70), de *P. chrysogenum* (SEQ ID NOs: 71 e 72), *A. nidulans* (SEQ ID NOs: 73 e 74), *A. clavatus* (SEQ ID NOs: 77 e 78), *L. mesenteroides* (SEQ ID NOs: 93 e 94), ou *O. oenii* (SEQ ID NOs: 101 e 102).

[00089] Tal como aqui utilizado, o termo "álcool desidrogenase" ou "ADH" destina-se a incluir as enzimas que catalisam a conversão de etanol em acetilaldeído. Muito frequentemente, a mesma enzima catalisa a reação inversa a partir de acetaldeído a etanol, que é a direcção mais relevante para a fermentação. O álcool desidrogenase

inclui aquelas enzimas que correspondem a CE 1.1.1.1 e 1.1.1.2 e exemplificados pelas enzimas descritos em número de acesso GenBank U49975.

[00090] Tal como aqui utilizado, o termo "aldeído desidrogenase", "ALD" ou "ALDH" destina-se a incluir as enzimas que catalisam a oxidação de aldeídos. Enzimas aldeído desidrogenase incluem "acetaldeído desidrogenase", que catalisa a conversão do acetaldeído em acetil-CoA. Muito frequentemente, a mesma enzima catalisa a reação inversa a partir de acetil-CoA a acetaldeído, que é a direção mais relevante para a fermentação. Aldeído desidrogenase inclui as enzimas que correspondem a CE 1.2.1.3, 1.2.1.4 e 1.2.1.10. Em algumas modalidades, acetaldeído desidrogenase é de *S. cerevisiae* (ALD2: SEQ ID NO: 17 e 18; ALD3: SEQ ID NO: 19 e 20; ALD4: SEQ ID NO: 21 e 22; ALD5: SEQ ID NO: 23 e 24; ALD6 ou SEQ ID NO: 25 e 26).

[00091] Tal como aqui utilizado, o termo "fosfotransacetilase" ou "ATP" destina-se a incluir as enzimas capazes de converter acetil-CoA para acetilfosfato. PTA inclui aquelas enzimas que correspondem a CE 2.3.1.8. Em algumas modalidades, PTA é de *B. adolescentis* (SEQ ID NOs: 1 e 10), *C. cellulolyticum* (SEQ ID NOs: 79 e 80), *C. phytofermentans* (SEQ ID NOs: 81 e 82), *B. bifidum* (SEQ ID NOs: 83 e 84), *B. animalis* (SEQ ID NOs: 85 e 86), *L. mesenteroides* (SEQ ID NOs: 95 e 96), ou *O. oenii* (SEQ ID NOs: 103 e 34).

[00092] Tal como aqui utilizado, o termo "acetato quinase" ou "ACK" destina-se a incluir as enzimas capazes de converter acetilfosfato para acetato. ACK inclui aquelas enzimas que correspondem a CE 2.7.2.12. Em algumas modalidades, é ACK de *B. adolescentis* (SEQ ID NOs: 2 e 16), *C. cellulolyticum* (SEQ ID NOs: 87 e 88), *C. phytofermentans* (SEQ ID NOs: 75 e 76), *L. mesenteroides* (SEQ ID NOs: 91 e 92), ou *O. oenii* (SEQ ID NOs: 99 e 100).

[00093] Tal como aqui utilizado, o termo "glicerol-3-fosfato

desidrogenase" ou "PIB" pretende incluir aquelas enzimas capazes de converter a di-hidroxiacetona fosfato para glicerol-3-fosfato. GPD inclui aquelas enzimas que correspondem a CE 1.1.1.8. Em algumas modalidades, o GPD é GPD1 e/ou GPD2 de *S. cerevisiae* (PIB1: SEQ ID NO: 27 e 28, GDP2: SEQ ID NO: 29 e 30).

[00094] Tal como aqui utilizado, o termo "glicerol-3-fosfato fosfatase" pretende incluir aquelas enzimas capazes de converter o glicerol-1-fosfato a glicerol. Glicerol-3-fosfato pretende incluir aquelas enzimas que correspondem a CE 3.1.3.21.

[00095] Tal como aqui utilizado, o termo "formato desidrogenase" ou "FDH" pretende incluir aquelas enzimas capazes de converter formiato a bicarbonato (dióxido de carbono). Formato desidrogenase inclui as enzimas que correspondem a CE 1.2.1.43 e EC 1.2.1.2. Em algumas modalidades, o FDH é de *S. cerevisiae* (FDH1: SEQ ID NO: 31, e 32, FDH2: SEQ ID NO: 33).

[00096] Tal como aqui utilizado, o termo "transaldolase" pretende incluir aquelas enzimas capazes de converter gliceraldeído-3-fosfato a frutose-6-fosfato. Transaldolase pretende incluir aquelas enzimas que correspondem a CE 2.2.1.2. Em algumas modalidades, a transaldolase é de *S. cerevisiae* (TAL1: SEQ ID NO: 35 e 36).

[00097] Tal como aqui utilizado, o termo "transcetolase" pretende incluir aquelas enzimas capazes de converter sedoepulose-7-P e gliceraldeído-3-P para D-ribose-5-P e D-xilulose-5-P e aqueles enzimas capazes de converter a frutose-6-fosfato e gliceraldeído-3-P para D-xilulose 5-P e aldose eritrose-4-fosfato. Transcetolase pretende incluir aquelas enzimas que correspondem a CE 2.2.1.1. Em algumas modalidades, a transcetolase é de *S. cerevisiae* (TKL1: SEQ ID NO: 37 e 38).

[00098] Tal como aqui utilizado, o termo "ribose-5-P isomerase" ou "ribose-5-fosfato isomerase" pretende incluir aquelas enzimas capazes

de converter ribose-5-fosfato a ribulose-5-fosfato. Ribose-5-P isomerase pretende incluir aquelas enzimas que correspondem a CE 5.3.1.6. Em algumas modalidades, a ribose-5-P isomerase é de *S. cerevisiae* (RKI1: SEQ ID NO: 39 e 40).

[00099] Tal como aqui utilizado, o termo "ribulose-5-P 3-epimerase", "ribulose-5-fosfato 3-epimerase" ou "ribulose fosfato-3-epimerase" pretende incluir aquelas enzimas capazes de converter D-ribulose 5-fosfato a D-xilulose 5-fosfato. Ribulose-5-P 3-epimerase pretende incluir aquelas enzimas que correspondem a CE 5.1.3.1. Em algumas modalidades, a ribulose-5-P 3 epimerase é de *S. cerevisiae* (RPE1: SEQ ID NO: 41 e 42).

[000100] Tal como aqui utilizado, o termo "piruvato descarboxilase" ou "PDC" pretende incluir aquelas enzimas capazes de converter ácido pirúvico para o acetaldeído. PDC pretende incluir aquelas enzimas que correspondem a CE 4.1.1.1.

[000101] Tal como aqui utilizado, o termo "bifuncional" destina-se a incluir enzimas que catalisam a mais do que uma etapa de reação bioquímica. Um exemplo específico de uma enzima bifuncional aqui utilizado é uma enzima (adhE) que catalisa tanto as reações da álcool-desidrogenase e acetaldeído-desidrogenase, e inclui aquelas enzimas que correspondem a CE 1.2.1.10 e 1.1.1.1. Em algumas modalidades, a acetaldeído-álcool desidrogenase bifuncional é de *B. adolescentis* (adhE: SEQ ID NO: 43 e 44). Em algumas modalidades, a enzima bifuncional é uma acetaldeído-álcool desidrogenase NADPH bifuncional específica, e inclui aquelas enzimas que correspondem a CE 1.2.1.10 e 1.1.1.2. Em algumas modalidades, a acetaldeído-álcool desidrogenase NADPH bifuncional específica é de *L. mesenteroides* (SEQ ID NO: 89 e 90) ou de *Oenococcus oeni* (SEQ ID NO: 97 e 98).

[000102] Tal como aqui utilizado, o termo "piruvato formato liase" ou "PFL" destina-se a incluir as enzimas capazes de converter piruvato em

formato e acetil-CoA. PFL inclui aquelas enzimas que correspondem a CE 2.3.1.54 e exemplificado por SEQ ID NO: 47 e SEQ ID NO: 48.

[000103] Tal como aqui utilizado, "enzimas de ativação de PFL", o termo pretende incluir aquelas enzimas capazes de auxiliar na ativação de PFL. Enzimas de ativação de PFL incluem aquelas enzimas que correspondem a CE 1.97.1.4 e exemplificado por SEQ ID NO: 45 e SEQ ID NO: 46.

[000104] O termo "matéria-prima" é definida como uma matéria-prima ou mistura de matérias-primas fornecidas a um processo de fermentação de microrganismos ou de outros produtos que podem ser feitas. Por exemplo, uma fonte de carbono, tais como biomassa ou os compostos de carbono derivado de biomassa são uma matéria-prima para um microrganismo que produz um produto de um processo de fermentação. A matéria-prima pode conter outros do que uma fonte de carbono nutrientes.

[000105] A biomassa pode incluir qualquer tipo de biomassa conhecidos na técnica ou aqui descritos. Os termos "material lignocelulósico", "substrato lignocelulósico" e "biomassa celulósica", qualquer tipo de carbono contendo estoque alimentação animal, incluindo a biomassa lenhosa, como a fibra de polpa de madeira reciclados, serragem, madeira, fibra longa, gramíneas, resíduos de processamento de açúcar, resíduos agrícolas, tais como, mas não limitado a, palha de arroz, casca de arroz, palha de cevada, espigas de milho, palha de cereal, palha de trigo, palha de canola, palha de aveia, cascas de aveia, fibra de milho, palha de, suculentas, agave, ou qualquer combinação dos mesmos.

[000106] O termo "rendimento" é definido como a quantidade de produto obtido por unidade de peso de matéria-prima e pode ser expressa como grama de produto por grama de substrato (g/g). Rendimento pode ser expressa como uma percentagem do rendimento

teórico. "Rendimento teórico" é definido como a quantidade máxima de produto que pode ser gerado por uma determinada quantidade de substrato como ditado pela estequiometria da via metabólica usado para fazer o produto. Por exemplo, o rendimento teórico para uma conversão típica de glucose em etanol é EtOH 0,51 g por 1 g de glucose. Como tal, um rendimento de 4,8 g de etanol a partir de 10 g de glucose será expresso como 94% do rendimento teórico ou 94% do valor teórico.

[000107] O termo "título" é definido como a força de uma solução ou a concentração de uma substância em solução. Por exemplo, o título de um produto de um caldo de fermentação é descrita como grama de produto em solução por litro de caldo de fermentação (g/L), ou em g/kg de caldo.

[000108] Tal como aqui utilizado, o termo "fluxo" é a taxa de fluxo de moléculas através de uma via metabólica, semelhante ao fluxo de material em processo.

[000109] "Bactérias", ou "eubactérias", se refere a um domínio de organismos procariotas. As bactérias incluem (Gram +) bactérias gram-positivas e (Gram -) bactérias gram-negativas.

[000110] A "levedura" se refere a um domínio de organismos eucarióticos unicelulares que são fungos.

[000111] Os termos "derivado" e "análogo" se refere a um polipeptídeo que difere das enzimas da invenção, mas conservando as propriedades essenciais deste. De um modo geral, derivados e análogos são em geral muito semelhantes, e, em muitas regiões, idênticas às enzimas da invenção. Os termos "derivados", "derivado" e "análogo" quando se refere a enzimas da invenção incluem quaisquer polipeptídeos que retêm pelo menos uma parte da atividade do polipeptídeo nativo correspondente ou a atividade do seu domínio catalítico.

[000112] Os derivados de enzimas aqui descritos são polipeptídeos, que podem ter sido alterados por forma a apresentar características não

encontradas no polipeptídeo nativo. Os derivados podem ser covalentemente modificada através de substituição (por exemplo, substituição de um aminoácido), química, enzimática ou outro meio apropriado com uma porção que não um aminoácido de ocorrência natural (por exemplo, uma porção detectável tal como uma enzima ou um radioisótopo). Exemplos de derivados incluem proteínas de fusão ou proteínas que têm por base uma sequência de proteína que ocorre naturalmente, mas que foram alterados. Por exemplo, as proteínas podem ser concebidas pelo conhecimento de uma sequência de aminoácidos em particular, e/ou uma estrutura secundária, terciária e quaternária particular. Os derivados incluem proteínas que são modificados com base no conhecimento de uma sequência anterior, natural ou sintética, que é então opcionalmente modificada, muitas vezes, mas não necessariamente para conferir alguma função melhorada. Estas sequências, ou proteínas são então ditas como derivado a partir de uma sequência de proteína ou de aminoácidos em particular. Em algumas modalidades da invenção, um derivado deve reter, pelo menos, cerca de 50% de identidade de, pelo menos, cerca de 60% de identidade de, pelo menos, cerca de 70% de identidade de, pelo menos, cerca de 80% de identidade de, pelo menos, cerca de 90% de identidade de, pelo menos, cerca de 95 % de identidade de, pelo menos, cerca de 97% de identidade, ou pelo menos cerca de 99% de identidade com a sequência do derivado é "derivada de". Em algumas modalidades da invenção, uma enzima é dita como derivado de uma enzima encontrada naturalmente em uma determinada espécie se, usando técnicas de genética molecular, a sequência de DNA para uma parte ou a totalidade da enzima é amplificada e colocada em uma nova célula hospedeira.

[000113] O termo "percentagem de identidade", como conhecido na técnica, é uma relação entre duas ou mais sequências polipeptídicas ou

duas ou mais sequências polinucleotídicas, determinada por comparação das sequências. Na técnica, "identidade" também significa o grau de relação de sequências entre sequências polipeptídicas ou polinucleotídicas, conforme o caso pode ser, como determinado pela correspondência entre cadeias de tais sequências.

[000114] Como é conhecida na técnica, a "similaridade" entre dois polipeptídeos é determinada pela comparação da sequência de aminoácidos conservados e substitutos de aminoácidos dada pela polipeptídeo com a sequência de um segundo polipeptídeo.

[000115] "Identidade" e "semelhança" podem ser facilmente calculadas por métodos conhecidos, incluindo, mas não limitados aos descritos em: Computational Molecular Biology (Lesk, AM, ed) Oxford University Press, Nova Iorque (1988); Biocomputing: Informatics and Genome Projects (Smith, DW, ed) Academic Press, Nova Iorque (1993); Computer Analysis of Sequence Data, Part I (Griffin, AM, e Griffin, HG, eds.) Humana Press, NJ (1994); Analysis in Molecular Biology (von Heinje, G., ed.) Academic Press (1987); e Sequence Analysis Primer (Gribskov, M. e Devereux, J., eds.), Stockton Press, Nova Iorque (1991). Os métodos preferidos para determinar a identidade são projetados para dar a melhor correspondência entre as sequências testadas. Métodos para determinar a identidade e semelhança estão codificados em programas de computador disponíveis publicamente. Os alinhamentos de sequências e cálculos da percentagem de identidade podem ser realizados utilizando o programa Megalign de LASERGENE bioinformatics computing suite (DNASTAR Inc., Madison, Wis.). Alinhamentos múltiplos das sequências aqui divulgadas foram realizados utilizando o método Clustal de alinhamento (Higgins e Sharp (1989) CABIOS. 5: 151-153) com os parâmetros por defeito (GAP PENALTY = 10, GAP LENGTH PENALTY = 10). Parâmetros predefinidos para os alinhamentos em pares utilizando o método Clustal

foram KTUPLE 1, GAP PENALTY = 3, JANELA = 5 e DIAGONAIS SAVED = 5.

[000116] Sequências adequadas de ácidos nucleicos ou seus fragmentos (polinucleotídeos isolados da presente invenção) codificam polipeptídeos que são pelo menos cerca de 70% a 75% idênticas às sequências de aminoácidos aqui descritas, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 85% , ou pelo menos cerca de 90% idênticas às sequências de aminoácidos aqui descritas, ou pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 96%, pelo menos cerca de 97%, pelo menos cerca de 98%, pelo menos cerca de 99%, ou pelo menos cerca de 100% idênticas às sequências de aminoácidos aqui divulgadas. Os fragmentos de ácidos nucleicos adequados são, pelo menos, cerca de 70%, pelo menos cerca de 75%, ou pelo menos cerca de 80% idênticas às sequências de ácido nucleico aqui revelados, pelo menos, cerca de 80%, pelo menos cerca de 85%, ou pelo menos cerca de 90% idênticas às sequências de ácido nucleico aqui descritas, ou pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 96%, pelo menos cerca de 97%, pelo menos cerca de 98%, pelo menos cerca de 99%, ou pelo menos cerca de 100% idêntica à nucleico sequências de ácidos aqui divulgado. Fragmentos de ácido nucleico adequados não só têm as identidades/semelhanças acima, mas tipicamente codificam um polipeptídeo possuindo pelo menos cerca de 50 aminoácidos, pelo menos cerca de 100 aminoácidos, pelo menos cerca de 150 aminoácidos, pelo menos cerca de 200 aminoácidos, ou pelo menos cerca de 250 aminoácidos.

[000117] Em algumas modalidades da presente invenção, os genes exógenos podem ser códons otimizados de modo a expressar o polipeptídeo que codificam mais eficientemente na célula hospedeira. Os métodos de otimização de códons são bem conhecidos na arte. (Ver, por exemplo, Welch e outros "Designing genes para a expressão bem-sucedida de proteína." *Methods Enzymol* 2011. 498:... 43-66)

[000118] Em geral, os genes altamente expressos em um organismo são desviadas para códons que são reconhecidos pela espécie de RNAt mais abundantes naquele organismo. Uma medida desta tendência é o "índice de adaptação de códon" ou "CAI", que mede o grau em que os códons utilizados para codificar cada um dos aminoácidos em um gene particular, são aquelas que ocorrem mais frequentemente em um conjunto de referência a partir de genes altamente expressos um organismo. O Índice de Adaptação de Códon é descrito em mais detalhe em Sharp e outros, "The Codon Adaptation Index: a Measure of Directional Synonymous Codon Usage Bias, and Its Potential Applications." *Nucleic Acids Research* 15: 1281-1295, que é aqui incorporada por referência na sua totalidade.

[000119] A sequência de códons otimizados pode ser ainda modificada para expressão em um organismo em particular, dependendo de restrições biológicas que do organismo. Por exemplo, grandes séries de "comos" ou "Ts" (por exemplo, é executado mais do que 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10 bases consecutivas) podem efetuar a transcrição negativamente. Portanto, ele pode ser útil para remover uma corrida, por exemplo, a substituição de pelo menos um nucleotídeo na corrida com outro nucleotídeo. Além disso, os sítios de enzimas de restrição específicos podem ser removidos para fins de clonagem molecular por substituição de pelo menos um nucleotídeo no sítio de restrição com outro nucleotídeo. Exemplos de sítios de enzimas de restrição incluem tais Pacl, Ascl, BamHI, BglII, EcoRI e XhoI. Além disso, a sequência de DNA pode ser verificada por repetições diretas, repetições invertidas e repetições espelho com comprimentos de cerca de 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 bases ou mais. Funciona de "comos" ou "ts", sítios de restrição e/ou repetições pode ser modificado por substituição de pelo menos um códon no interior da sequência com os "melhores segundos" códons, isto é, o códon que ocorre na segunda frequência

mais alta para um determinado aminoácido dentro do organismo particular para a qual a sequência está a ser otimizado.

[000120] Os desvios da sequência de nucleotídeos que compreendem os códons que codificam os aminoácidos de qualquer cadeia polipeptídica para permitir variações na sequência de codificação para o gene. Uma vez que cada códon é constituído por três nucleotídeos, e os nucleotídeos compreendendo DNA estão restritos a quatro bases específicas, existem 64 possíveis combinações de nucleotídeos, que codificam 61 de aminoácidos (os restantes três códons codificam sinais que terminam a tradução). O "código genético" que mostra que códons codificam aminoácidos que é aqui reproduzida como Tabela 1. Como resultado, muitos aminoácidos são designados por mais de um códon. Por exemplo, a alanina e prolina aminoácidos são codificados por quatro tripletos, serina e arginina por seis tripletos cada, enquanto o triptofano e metionina são codificados por apenas um tripleto. Esta degenerescência permite a composição de bases de DNA para variar em uma larga gama sem alterar a sequência de aminoácidos das proteínas codificadas pelo DNA.

Tabela 1: O Código Genético Padrão

	T	C	A	G
T	TTT Phe (F) TTC " TTA Leu (L) TTG "	TCT Ser (S) TCC " TCA " TCG "	TAT Tyr (Y) TAC " TAA Ter TAG Ter	TGT Cys (C) TGC TGA Ter TGG Trp (W)
C		CTT Leu (L) CTC " CTA "	CCT Pro (P) CCC " CCA "	CAT His (H) CAC " CAA Gln CGT Arg (R) CGC " CGA "

	CTG "	CCG "	(Q) CAG "	CGG "
A	ATT Ile (I) ATC " ATA " ATG Met (M)	ACT Thr (T) ACC " ACA " ACG "	AAT Asn (N) AAC " AAA Lys (K) AAG "	AGT Ser (S) AGC " AGA Arg (R) AGG "
G	GTT Val (V) GTC " GTA " GTG "	GCT Ala (A) GCC " GCA " GCG "	GAT Asp (D) GAC " GAA Glu (E) GAG "	GGT Gly (G) GGC " GGA " GGG "

[000121] Muitos organismos exibem uma tendência para o uso de determinados códons para codificar para a inserção de um aminoácido particular na cadeia peptídica em crescimento. Preferência de códons ou desvio de códons, diferenças na utilização de códons entre os organismos, é proporcionada pela degenerescência do código genético, e está bem documentada entre muitos organismos. Desvio de códons muitas vezes se correlaciona com a eficácia de tradução de RNA mensageiro (mRNA), o qual é por sua vez que se acredita ser dependente, *inter alia*, as propriedades dos códons sendo traduzida e a disponibilidade de moléculas particulares de RNA de transferência (tRNA). A predominância de tRNAs selecionados em uma célula é geralmente um reflexo dos códons utilizados mais frequentemente na síntese de peptídeos. Consequentemente, os genes podem ser adaptados para expressão ótima de genes em um dado organismo baseado na otimização de códons.

Células hospedeiras

[000122] Em algumas modalidades da invenção, a célula hospedeira é um microrganismo eucariota. Em algumas modalidades, a célula hospedeira é uma levedura. Em algumas modalidades, a célula hospedeira é capaz de digerir e fermentar celulose. Em algumas modalidades, a célula hospedeira é a partir do gênero *Saccharomyces*. Em algumas modalidades, a célula hospedeira é *Saccharomyces cerevisiae*.

[000123] Em algumas modalidades, as células hospedeiras do invento são cultivadas a uma temperatura acima de cerca de 20 ° C, superior a cerca de 25 ° C, superior a cerca de 27 ° C, superior a cerca de 30 ° C, superior a cerca de 33 ° C, superior a cerca de 35 ° C, superior a cerca de 37 ° C, superior a cerca de 40 ° C, superior a cerca de 43 ° C, superior a cerca de 45 ° C, ou acima de cerca de 47 ° C.

[000124] Em algumas modalidades, as células hospedeiras da invenção contêm construções genéticas que levam à diminuição da regulação de um ou mais genes que codifica para um polipeptídeo, pelo menos, cerca de 80%, pelo menos cerca de 85%, pelo menos cerca de 90%, em menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 96%, pelo menos cerca de 97%, pelo menos cerca de 98%, pelo menos cerca de 99%, ou cerca de 100% idêntico a um ou mais dos polipeptídeos abrangidos pela EC 1.1.1.8, 3.1. 3,21, 1.2.1.43, 1.2.1.10 e/ou EC 1.2.1.2.

[000125] Em algumas modalidades, as células hospedeiras da invenção contêm construções genéticas que conduzem à expressão ou regulação positiva de um ou mais genes que codifica para um polipeptídeo, pelo menos, cerca de 80%, pelo menos cerca de 85%, pelo menos cerca de 90% , pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 96%, pelo menos cerca de 97%, pelo menos cerca de 98%, pelo menos cerca de 99%, ou cerca de 100% idêntico a um ou mais dos polipeptídeos codificados por SEQ ID NOs: 9 , 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 62, 64, 66, 68, 70 ,

72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, ou 102. Em algumas modalidades, as células hospedeiras da invenção contêm construções genéticas que leva a expressão ou regulação positiva de um polipeptídeo que codifica a atividade associada a CE Nos.: 4.1.2.9, 4.1.2.22, 2.3.1.8, 1.2.1.10, 1.2.1.3, 1.2.1.4, 1.1.1.1, 1.1.1.2, 2.7.2.12, 2.2.1.2, 2.2.1.1, 5.3.1.6, 5.1.3.1, 2.3.1.54, 1.97.1.4, 1.2.1.3, 1.2.1.4, 4.1.1.1 ou.

[000126] Em algumas modalidades, PHK é regulada positivamente. Em algumas modalidades, uma única especificidade fosfocetolase é regulada positivamente. Em algumas modalidades, de dupla especificidade fosfocetolase é regulada positivamente. Em algumas modalidades, a PHK regulada positivamente é de uma enzima que corresponde a um número CE selecionado a partir do grupo que consiste em: EC 4.1.2.9 e 4.1.2.22. Em algumas modalidades, o PHK é a partir de *A. niger*. Em algumas modalidades, o PHK é de *N. crassa*. Em algumas modalidades, o PHK é de *L. casei*. Em algumas modalidades, o PHK é de *L. plantarum*. Em algumas modalidades, o PHK é de *B. adolescentis*. Em algumas modalidades, o PHK é derivado de um gênero selecionado a partir do grupo que consiste de *Aspergillus*, *Neurospora*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Penicillium*. Em algumas modalidades, a fosfocetolase corresponde a um polipeptídeo selecionado a partir de um grupo consistindo em SEQ ID NOs: 9, 11, 12, 13, 14, 15, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 78, 94, ou 102.

[000127] Em algumas modalidades, fosfotransacetilase é regulada positivamente. Em algumas modalidades, a fosfotransacetilase regulada positivamente é de uma enzima que corresponde a CE 2.3.1.8. Em algumas modalidades, a fosfotransacetilase é de *B. adolescentis*. Em algumas modalidades, a fosfotransacetilase é derivado de um gênero selecionado a partir do grupo que consiste em *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* ou *Clostridium*. Em algumas modalidades, a

fosfotransacetilase corresponde a um polipeptídeo selecionado a partir de um grupo consistindo em SEQ ID NOs: 10, 34, 80, 82, 84, 86, ou 94.

[000128] Em algumas modalidades da invenção, acetato quinase é regulada positivamente. Em algumas modalidades, a acetato quinase é regulada a partir de uma enzima que corresponde a CE 2.7.2.12. Em algumas modalidades, a acetato quinase é de *B. adolescentis*. Em algumas modalidades, a acetato quinase é obtida a partir de um gênero selecionado a partir do grupo que consiste em *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* ou *Clostridium*. Em algumas modalidades, a acetato quinase corresponde a um polipeptídeo selecionado a partir de um grupo consistindo em SEQ ID NOs: 16, 88, 76, 92 ou 100.

[000129] Em algumas modalidades, acetaldeído-álcool desidrogenase bifuncional é regulada positivamente. Em algumas modalidades, a regulada positivamente bifuncional acetaldeído-álcool desidrogenase é de uma enzima que corresponde a um número CE selecionado a partir do grupo que consiste em: EC 1.2.1.0 e 1.1.1.1. Em algumas modalidades, o acetaldeído desidrogenase bifuncional é uma acetaldeído-álcool desidrogenase dependente de NADPH bifuncional selecionada a partir de um grupo de enzimas que têm os seguintes números de Comissão de enzima: EC 1.2.1.10 e 1.1.1.2. Em algumas modalidades, o acetaldeído-álcool desidrogenase bifuncional corresponde a um polipeptídeo selecionado a partir do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 44, 90, e 98

[000130] Em algumas modalidades, transaldolase é regulada positivamente. Em algumas modalidades, a transaldolase regulada positivamente é de uma enzima que corresponde a CE 2.2.1.2. Em algumas modalidades, a transaldolase é de *S. cerevisiae* e corresponde a um polipeptídeo codificado pela SEQ ID NO: 36. Em algumas modalidades, transcetolase é regulada positivamente. Em algumas modalidades, a transcetolase regulada positivamente é de uma enzima

que corresponde a CE 2.2.1.1. Em algumas modalidades, a transcetolase é de *S. cerevisiae* e corresponde a um polipeptídeo codificado pela SEQ ID NO: 38. Em algumas modalidades, ribose-5-P isomerase é regulada positivamente. Em algumas modalidades, a ribose-5-P isomerase regulada positivamente é de uma enzima que corresponde a CE 5.3.1.6. Em algumas modalidades, a de ribose-5-P isomerase é a partir de *S. cerevisiae* e corresponde a um polipeptídeo codificado pela SEQ ID NO: 40. Em algumas modalidades, a ribulose-5-P epimerase é regulada positivamente. Em algumas modalidades, a ribulose-5-P epimerase regulada positivamente é de uma enzima que corresponde a CE 5.1.3.1. Em algumas modalidades, a ribulose-5-P 3-epimerase é de *S. cerevisiae* e corresponde a um polipeptídeo codificado pela SEQ ID NO: 42. Em algumas modalidades, a piruvato descarboxilase é regulada positivamente. Em algumas modalidades, a piruvato-descarboxilase regulada positivamente é de uma enzima que corresponde a CE 4.1.1.1. Em algumas modalidades, álcool desidrogenase é regulada positivamente. Em algumas modalidades, a álcool desidrogenase regulada positivamente é uma enzima que corresponde a CE 1.1.1.1 e 1.1.1.2. Em algumas modalidades, piruvato formato liase é regulada positivamente. Em algumas modalidades, a piruvato formiato liase regulada positivamente é de uma enzima que corresponde a CE 2.3.1.54. Em algumas modalidades, a piruvato formiato liase corresponde a um polipeptídeo codificado pela SEQ ID NO: 48. Em algumas modalidades, a enzima ativadora de piruvato formato liase é regulada positivamente. Em algumas modalidades, a enzima ativadora de piruvato formato liase é regulada positivamente a partir de uma enzima que corresponde a CE 1.97.1.4. Em algumas modalidades, a enzima ativadora de piruvato formato liase corresponde a um polipeptídeo codificado pela SEQ ID NO: 46.

[000131] Em algumas modalidades, as células hospedeiras da

invenção contêm construções genéticas que conduzam a expressão ou regulação negativa de um ou mais genes que codifica para um polipeptídeo, pelo menos, cerca de 80%, pelo menos cerca de 85%, pelo menos cerca de 90% , pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 96%, pelo menos cerca de 97%, pelo menos cerca de 98%, pelo menos cerca de 99%, ou cerca de 100% idêntico a um ou mais dos polipeptídeos codificados por SEQ ID NOs: 18 , 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 ou o polinucleotídeo codificado pela SEQ ID NO: 33. Em algumas modalidades, as células hospedeiras da invenção contêm construções genéticas que conduzem à expressão ou regulação negativa de um polipeptídeo que codifica a atividade associada a CE Nos.: 1.2.1.3, 1.2.1.4, 1.2.1.10, 1.1.1.8 e 3.1.3.21.

[000132] Em algumas modalidades, GPD é regulada negativamente. Em algumas modalidades, a GPD regulada negativamente é de uma enzima que corresponde a CE 1.1.1.8. Em algumas realizações GPD1 e gpd2 de *S. cerevisiae* são regulados negativamente. Em algumas modalidades, a glicerol-3-fosfato desidrogenase é selecionada a partir do grupo que consiste em glicerol-3-fosfato-desidrogenase 1, glicerol-3-fosfato-desidrogenase 2, e as suas combinações. Em algumas modalidades, a glicerol-3-fosfato desidrogenase 1 é de *S. cerevisiae* e corresponde a um polipeptídeo codificado pela SEQ ID NO: 28. Em algumas modalidades, a glicerol-3-fosfato desidrogenase-2 é a partir de *S. cerevisiae* e corresponde um polipeptídeo codificado por SEQ ID NO: 30. Em algumas modalidades, formato desidrogenase é regulada negativamente. Em algumas modalidades, a formiato desidrogenase regulada negativamente corresponde a um número CE selecionado a partir do grupo que consiste em: EC 1.2.1.43 e EC 1.2.1.2. Em algumas modalidades, formato desidrogenase de *S. cerevisiae* é regulada negativamente. Em algumas modalidades, a formato desidrogenase de *S. cerevisiae* corresponde a um polipeptídeo correspondente à SEQ ID

NO: 32 ou um polinucleotídeo que corresponde a SEQ ID NO: 33. Em algumas modalidades, glicerol-3-fosfato fosfatase é regulada negativamente. Em algumas modalidades, a glicerol-3-fosfato fosfatase regulada negativamente corresponde a CE 3.1.3.21.

[000133] Em algumas modalidades, a aldeído desidrogenase é regulada negativamente. Em algumas modalidades, a aldeído desidrogenase é regulada positivamente. Em algumas modalidades, a aldeído desidrogenase é uma enzima que corresponde a CE 1.2.1.10, EC 1.2.1.3, EC 1.2.1.4 ou. Em algumas modalidades, a aldeído desidrogenase é acetaldeído desidrogenase. Em algumas modalidades, a enzima desidrogenase é selecionada a partir de acetaldeído Ald2, Ald3, Ald4, Ald5, e Ald6 em *S. cerevisiae*. Em algumas modalidades, o acetaldeído desidrogenase de *S. cerevisiae* corresponde a uma sequência de polipeptídeo selecionado a partir do grupo que consiste em: SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, e SEQ ID NO: 26.

[000134] Em algumas modalidades, fosfoacetolase, fosfotransacetilase bifuncional e acetaldeído-álcool desidrogenase são regulada positivamente, e, pelo menos, um glicerol-3-fosfato desidrogenase é regulada negativamente.

[000135] Em algumas modalidades, fosfotransacetilase, acetaldeído-álcool desidrogenase bifuncional, e, pelo menos, um aldeído desidrogenase são regulados positivamente. Em algumas modalidades, fosfotransacetilase, acetaldeído-álcool desidrogenase bifuncional, pelo menos, um aldeído desidrogenase são regulada positivamente, e, pelo menos, um glicerol-3-fosfato desidrogenase é regulada negativamente. Em algumas modalidades, fosfotransacetilase, acetato quinase, acetaldeído-álcool desidrogenase bifuncional, e, pelo menos, um aldeído desidrogenase são regulados positivamente. Em algumas modalidades, fosfotransacetilase, acetato quinase e acetaldeído-álcool

desidrogenase bifuncional é regulada positivamente, e, pelo menos, um glicerol-3-fosfato desidrogenase é regulada negativamente. Em algumas modalidades, pelo menos uma enzima aldeído desidrogenase é também regulada negativamente. Em algumas modalidades, a aldeído desidrogenase é acetaldeído desidrogenase.

[000136] Em algumas modalidades, fosfocetolase, fosfotranscetilase, acetaldeído-álcool desidrogenase bifuncional, piruvato formato liase, e enzima de ativação de piruvato formato liase são regulada positivamente, e, pelo menos, um glicerol-3-fosfato desidrogenase é regulada negativamente.

[000137] Em algumas modalidades, fosfocetolase, acetato quinase e acetaldeído-álcool desidrogenase bifuncional são regulada positivamente, e, pelo menos, um glicerol-3-fosfato desidrogenase é regulada negativamente.

[000138] Em algumas modalidades, fosfocetolase, acetato quinase, acetaldeído-álcool desidrogenase bifuncional, piruvato formato liase, e enzima de ativação de piruvato formato liase está regulada positivamente, e pelo menos uma glicerol-3-fosfato desidrogenase é regulada negativamente.

[000139] Em algumas modalidades, GPD1, gpd2, fdh1, e/ou fdh2 está regulada negativamente. Em algumas modalidades, GPD1, gpd2, fdh1 e fdh2 são regulados negativamente, e PHK, acetaldeído-álcool desidrogenase bifuncional (AdhE) e PTA são reguladas positivamente. Em algumas modalidades, GPD1, gpd2, fdh1 e fdh2 são regulados negativamente, e *B. adolescentis* PHK, AdhE e PTA de *B. adolescentis* são regulados positivamente em células de *S. cerevisiae*. Em algumas modalidades, GPD1, gpd2, fdh1 e fdh2 são regulados negativamente, e *L. plantarum* PHK1, AdhE e PTA de *B. adolescentis* são regulados positivamente em células de *S. cerevisiae*. Em algumas modalidades, GPD1, gpd2, fdh1 e fdh2 são regulados negativamente, e *L. plantarum*

PHK2, AdhE, PTA de *B. adolescentis* são regulados positivamente em células de *S. cerevisiae*. Em algumas modalidades, GPD1, gpd2, fdh1 e fdh2 são regulados negativamente, e *A. niger* PHK, AdhE e PTA de *B. adolescentis* são regulados positivamente em células de *S. cerevisiae*. Em algumas modalidades, GPD1, gpd2, fdh1 e fdh2 são regulados negativamente, e *L. casei* PHK1, AdhE e PTA de *B. adolescentis* são regulados positivamente em células de *S. cerevisiae*. Em algumas modalidades, GPD1, gpd2, fdh1 e fdh2 são regulados negativamente, e *L. casei* PHK2, AdhE e PTA de *B. adolescentis* são regulados positivamente em células de *S. cerevisiae*. Em algumas modalidades, GPD1, gpd2, fdh1 e/ou fdh2 são regulados negativamente, PHK, *B. adolescentis* AdhE e PTA de *B. adolescentis* são regulados positivamente em células de *S. cerevisiae*. Em algumas modalidades, as enzimas reguladas positivamente são integradas. Em algumas modalidades, as enzimas reguladas positivamente são expressas utilizando um vetor de expressão. Em algumas modalidades, GPD1, gpd2, fdh1 e/ou fdh2 são regulados negativamente, e *B. adolescentis* PHK, acetaldeído-álcool desidrogenase bifuncional de *B. adolescentis*, PTA de *B. adolescentis*, Piruvato formiato liase de *B. adolescentis* e enzima de ativação de piruvato formiato liase de *B. adolescentis* são reguladas. Em algumas modalidades, fcy é regulada negativamente.

[000140] Em algumas modalidades, GPD1, gpd2, fdh1 e/ou fdh2 está regulado negativamente, e PHK, acetaldeído-álcool desidrogenase bifuncional (AdhE), ACK e PTA são reguladas. Em algumas modalidades, GPD1, gpd2, fdh1 e/ou fdh2 são regulados negativamente, e PHK, AdhE de *B. adolescentis*, ACK de *B. adolescentis*, e PTA de *B. adolescentis* são regulados positivamente em células de *S. cerevisiae*. Em algumas modalidades, GPD1, gpd2, fdh1 e/ou fdh2 são regulados negativamente, e PHK1, AdhE de *L. plantarum*, ACK de *B. adolescentis* e PTA de *B. adolescentis* são regulados

positivamente em células de *S. cerevisiae*. Em algumas modalidades, GPD1, gpd2, fdh1 e/ou fdh2 são regulados negativamente, e PHK2, AdhE de *L. plantarum*, ACK de *B. adolescentis*, e PTA de *B. adolescentis* são regulados positivamente em células de *S. cerevisiae*. Em algumas modalidades, GPD1, gpd2, fdh1 e/ou fdh2 são regulados negativamente, e PHK, AdhE de *A. niger*, ACK de *B. adolescentis* e PTA de *B. adolescentis* são regulados positivamente em células de *S. cerevisiae*. Em algumas modalidades, GPD1, gpd2, fdh1 e/ou fdh2 são regulados negativamente, e PHK1, AdhE de *L. casei*, ACK de *B. adolescentis* e PTA de *B. adolescentis* são regulados positivamente em células de *S. cerevisiae*. Em algumas modalidades, GPD1, gpd2, fdh1 e/ou fdh2 são regulados negativamente, e PHK2, AdhE de *L. casei*, ACK de *B. adolescentis*, e PTA de *B. adolescentis* são regulados positivamente em células de *S. cerevisiae*. Em algumas modalidades, GPD1, gpd2, fdh1 e/ou fdh2 são regulados negativamente, PHK, AdhE de *B. adolescentis*, PTA de *B. adolescentis* e ACK de *B. adolescentis* são regulados positivamente em células de *S. cerevisiae*. Em algumas modalidades, as enzimas reguladas positivamente são integradas. Em algumas modalidades, as enzimas reguladas positivamente são expressas utilizando um vetor de expressão. Em algumas modalidades, GPD1, gpd2, fdh1 e/ou fdh2 são regulados negativamente, e PHK de *B. adolescentis*, acetaldeído-álcool desidrogenase bifuncional de *B. adolescentis*, PTA de *B. adolescentis*, ACK de *B. adolescentis*, piruvato formato liase de *B. adolescentis*, e enzimas ativadoras de Piruvato formiato liase de *B. adolescentis* são reguladas.

[000141] Em algumas modalidades, GPD1, gpd2, fdh1 e/ou fdh2 está regulada negativamente, e acetaldeído-álcool desidrogenase bifuncional (AdhE), ACK e PTA são reguladas positivamente. Em algumas modalidades, GPD1, gpd2, fdh1 e/ou fdh2 são regulados negativamente, e AdhE, ACK, e PTA de *B. adolescentis* são regulados

positivamente em células de *S. cerevisiae*. Em algumas modalidades, as enzimas reguladas positivamente são integradas. Em algumas modalidades, as enzimas reguladas positivamente são expressas utilizando um vetor de expressão. Em algumas modalidades, GPD1, gpd2, fdh1 e/ou fdh2 são regulados negativamente, AdhE, PTA e ACK de *B. adolescentis* são regulados positivamente em células de *S. cerevisiae*. Em algumas modalidades, GPD1, gpd2, fdh1 e/ou fdh2 são regulados negativamente, e acetaldeído-álcool desidrogenase bifuncional *B. adolescentis*, PTA de *B. adolescentis*, ACK de *B. adolescentis*, piruvato formiato liase e enzima de ativação de Piruvato formiato liase de *B. adolescentis* são reguladas. Em algumas modalidades, ALD2, ALD3, ALD4 de *S. cerevisiae*, ou suas combinações são regulados negativamente e ALD6, ALD5, de *S. cerevisiae* ou suas combinações são regulados positivamente.

[000142] Em algumas modalidades, GPD1, gpd2, fdh1 e/ou fdh2 está regulada negativamente, AdhE, PTA e ACK de *B. adolescentis* são regulados positivamente em células de *S. cerevisiae*.

Produção de Etanol

[000143] Para um microrganismo para produzir etanol mais economicamente, é desejado para produzir um rendimento elevado. Em uma modalidade, o único produto produzido é o etanol. Produtos extra conduzir a uma redução no rendimento do produto e um aumento nos custos de capital e de funcionamento, em particular se os produtos extra têm pouco ou nenhum valor. Produtos extra também requerem custos de capital e de funcionamento adicionais para separar estes produtos a partir de etanol.

[000144] A produção de etanol pode ser medida utilizando qualquer método conhecido na técnica. Por exemplo, a quantidade de etanol em amostras de fermentação pode ser avaliada por meio de análise por HPLC. Além disso, muitos estoques de ensaio etanol estão

comercialmente disponíveis, por exemplo, ensaios baseados em enzima álcool oxidase. Os métodos para determinar a produção de etanol estão dentro do âmbito dos especialistas na matéria a partir dos ensinamentos aqui contidos.

[000145] Em algumas modalidades da invenção, onde o fluxo de carbono redirecionada gera um aumento da produção de etanol, a produção de etanol pode ser melhorada por seleção acoplados-crescimento. Por exemplo, a cultura contínua ou culturas de diluição em série podem ser executadas para selecionar as células que crescem mais rapidamente e/ou produção de etanol (ou de qualquer produto desejado) de forma mais eficiente sobre uma matéria-prima pretendida.

[000146] Uma modalidade da presente invenção se refere a um método para produzir etanol a partir de um microrganismo aqui descrito em que o referido microrganismo é cultivado na presença de um carbono contendo matéria-prima durante o tempo suficiente para produzir etanol e, opcionalmente, extrair o etanol.

[000147] O etanol pode ser extraído por métodos conhecidos na arte. (Ver, por exemplo, Publicação de Pedido de Patente US No. 2011/0171709, que é aqui incorporado por referência).

[000148] Uma outra modalidade da presente invenção se refere a um método para produzir etanol a partir de uma co-cultura composto por, pelo menos, dois microrganismos em que pelo menos um dos organismos é um organismo aqui descrito, e pelo menos um dos organismos é um microrganismo geneticamente distinta. Em algumas modalidades, o microrganismo geneticamente distinto é uma levedura ou bactéria. Em algumas modalidades, o microrganismo geneticamente distinto é qualquer organismo do gênero *Issatchenkia*, *Pichia*, *clavispora*, *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Trichoderma*, *Thermoascus*, *Escherichia*, *Clostridium*, *Caldicellulosiruptor*, *Thermoanaerobacter* e *Thermoanaerobacterium*.

[000149] Em algumas modalidades, o microrganismo recombinante produz cerca de 2 a cerca de 3% mais elevado título de etanol do que um tipo selvagem, organismo não recombinante; pelo menos cerca de 1 para pelo menos cerca de 2% maior do que um título de etanol de tipo selvagem, organismo não recombinante; pelo menos cerca de 1 para pelo menos cerca de 5% mais elevado título de etanol do que um tipo selvagem, organismo não recombinante; pelo menos cerca de 1 para pelo menos cerca de 7% maior do que um título de etanol de tipo selvagem, organismo não recombinante; pelo menos cerca de 1 para pelo menos cerca de 10% mais elevado do que um título de etanol de tipo selvagem, organismo não recombinante; pelo menos cerca de 1 para pelo menos cerca de 15% mais elevado do que um título de etanol de tipo selvagem, organismo não recombinante; pelo menos cerca de 1 para pelo menos cerca de 20% mais elevado do que um título de etanol de tipo selvagem, organismo não recombinante; pelo menos cerca de 1 para pelo menos cerca de 30% mais elevado do que um título de etanol de tipo selvagem, organismo não recombinante; pelo menos cerca de 1 para pelo menos cerca de 50% mais elevado do que um título de etanol de tipo selvagem, organismo não recombinante; pelo menos cerca de 1 para pelo menos cerca de 75% mais elevado do que um título de etanol de tipo selvagem, organismo não recombinante; pelo menos cerca de 1 para pelo menos cerca de 100% maior do que um título de etanol de tipo selvagem, organismo não-recombinante.

[000150] Em algumas modalidades, o microrganismo recombinante produz, pelo menos, cerca de 0,5 g/L de etanol a pelo menos cerca de 2 g/L de etanol, pelo menos, cerca de 0,5 g/L de etanol a pelo menos cerca de 3 g/L de etanol, pelo menos cerca de 0,5 g/L de etanol a pelo menos cerca de 5 g/L de etanol, pelo menos, cerca de 0,5 g/L de etanol a pelo menos cerca de 7 g/L de etanol, pelo menos, cerca de 0,5 g/L de etanol a pelo menos cerca de 10 g/L de etanol , pelo menos cerca de

0,5 g/L de etanol a pelo menos cerca de 15 g/L de etanol, pelo menos, cerca de 0,5 g/L de etanol a pelo menos cerca de 20 g/L de etanol, pelo menos, cerca de 0,5 g/L de etanol a pelo menos cerca de 30 g/L de etanol, pelo menos, cerca de 0,5 g/L de etanol a pelo menos cerca de 40 g/L de etanol, pelo menos, cerca de 0,5 g/L de etanol a pelo menos cerca de 50 g/L de etanol, pelo menos, cerca de 0,5 g/L de etanol a pelo menos cerca de 75 g/L de etanol, ou, pelo menos, cerca de 0,5 g/L de etanol a pelo menos cerca de 99 g/L de etanol por 24 horas de incubação em um material de alimentação contendo carbono.

[000151] Em algumas modalidades, o microrganismo recombinante produz etanol, pelo menos, cerca de 55% a pelo menos cerca de 75% do rendimento teórico, pelo menos cerca de 50% a pelo menos cerca de 80% do rendimento teórico, pelo menos cerca de 45% a pelo menos cerca de 85% do rendimento teórico, pelo menos cerca de 40% a pelo menos cerca de 90% do rendimento teórico, pelo menos cerca de 35% a pelo menos cerca de 95% do rendimento teórico, pelo menos cerca de 30% a pelo menos cerca de 99% do valor teórico rendimento, ou pelo menos cerca de 25% a pelo menos cerca de 99% do rendimento teórico.

[000152] Em algumas modalidades, métodos de produção de etanol podem compreender o contato de uma alimentação de biomassa com uma célula hospedeira ou de co-cultura da invenção e, adicionalmente, o contato da matéria-prima de biomassa com enzimas sacarolíticas produzidos externamente. Em algumas modalidades, as células hospedeiras são geneticamente manipuladas (por exemplo, transduzidas, transformadas ou transfectadas) com os polinucleotídeos que codificam enzimas sacarolíticas.

[000153] Uma "enzima sacarolíticas" pode ser qualquer enzima envolvida na digestão de hidratos de carbono, metabolismo e/ou hidrólise, incluindo amilases, celulasas, hemicelulasas, celulolítica e enzimas amilolíticas acessórias, inulinases, levanases e enzimas de

açúcar utilizando pentose. Enzimas sacarolíticas produzidos externamente exemplificativas estão disponíveis comercialmente e são conhecidos dos peritos na técnica e incluem glucoamilases.

Produção de Glicerol

[000154] Em algumas modalidades da invenção, onde o fluxo de carbono redirecionada gera um aumento da produção de etanol, o glicerol de saída pode ser diminuída por seleção acoplados-crescimento. Por exemplo, a cultura contínua ou culturas de diluição em série podem ser executadas para selecionar as células que produzem menos de glicerol em uma matéria-prima pretendida. O glicerol pode ser medido, por exemplo, por análise de HPLC das concentrações de metabólito.

[000155] Em algumas modalidades, o microrganismo recombinante produz, pelo menos, cerca de 20% a pelo menos cerca de 30% menos do que um tipo selvagem de glicerol, organismo não recombinante; pelo menos cerca de 15% a pelo menos cerca de 30% menos do que um tipo selvagem de glicerol, organismo não recombinante; pelo menos cerca de 10% a pelo menos cerca de 40% menos do que um tipo selvagem de glicerol, organismo não recombinante; pelo menos cerca de 10% a pelo menos cerca de 50% menos do que um tipo selvagem de glicerol, organismo não recombinante; pelo menos cerca de 10% a pelo menos cerca de 60% menos do que um tipo selvagem de glicerol, organismo não recombinante; pelo menos cerca de 10% a pelo menos cerca de 70% menos do que um tipo selvagem de glicerol, organismo não recombinante; pelo menos cerca de 10% a pelo menos cerca de 80% menos do que um tipo selvagem de glicerol, organismo não recombinante; pelo menos cerca de 10% a pelo menos cerca de 90% menos do que um tipo selvagem de glicerol, organismo não recombinante; pelo menos cerca de 10% a pelo menos cerca de 99% menos do que um tipo selvagem de glicerol, organismo não

recombinante; pelo menos cerca de 10% a pelo menos cerca de 100% menos do que um tipo selvagem de glicerol, organismo não recombinante; pelo menos cerca de 5% a pelo menos cerca de 100% menos do que um tipo selvagem de glicerol, organismo não recombinante; pelo menos cerca de 1% a pelo menos cerca de 100% menos do que um tipo selvagem de glicerol, organismo não-recombinante.

[000156] Em algumas modalidades, o microrganismo recombinante produz glicerol, pelo menos, cerca de 50% a pelo menos cerca de 99% do rendimento teórico, pelo menos cerca de 45% a pelo menos cerca de 80% do rendimento teórico, pelo menos cerca de 40% a pelo menos cerca de 85% do rendimento teórico, pelo menos cerca de 30% a pelo menos cerca de 80% do rendimento teórico, pelo menos cerca de 25% a pelo menos cerca de 50% do rendimento teórico, pelo menos cerca de 20% a pelo menos cerca de 50% do valor teórico rendimento, pelo menos cerca de 15% a pelo menos cerca de 50% do rendimento teórico, pelo menos cerca de 10% a pelo menos cerca de 50% do rendimento teórico, pelo menos cerca de 5% a pelo menos cerca de 50% do rendimento teórico, pelo menos cerca de 4% a pelo menos cerca de 50% do rendimento teórico, pelo menos cerca de 3% a pelo menos cerca de 50% do rendimento teórico, pelo menos, cerca de 2% a pelo menos cerca de 50% do rendimento teórico, pelo menos cerca de 1% a pelo menos cerca de 50% do rendimento teórico, pelo menos cerca de 1% a pelo menos cerca de 25% do rendimento teórico, pelo menos cerca de 1% a pelo menos cerca de 20% do rendimento teórico ou, pelo menos, cerca de 1% a pelo menos cerca de 10% do valor teórico Rendimento. Em algumas modalidades, o microrganismo recombinante produz glicerol a menos de cerca de 1% do rendimento teórico. Em algumas modalidades, o microrganismo recombinante produz nenhum glicerol.

[000157] Em algumas modalidades, o microrganismo recombinante tem uma taxa de crescimento, pelo menos, cerca de 1/2 a cerca de, pelo menos, igual à taxa de crescimento de um tipo selvagem, organismo não recombinante, pelo menos, cerca de 1/4 a cerca de, pelo menos, igual a a taxa de crescimento de um tipo selvagem, organismo não recombinante, pelo menos cerca de 1/8 a cerca de, pelo menos, igual à taxa de crescimento de um tipo selvagem, organismo não-recombinante, pelo menos cerca de 1/10 até, pelo menos, aproximadamente igual ao crescimento uma taxa de tipo selvagem, organismo não recombinante, pelo menos cerca de 1/25 para cerca de, pelo menos, igual à taxa de crescimento de um tipo selvagem, organismo não-recombinante, pelo menos cerca de 1/50 até, pelo menos, aproximadamente igual à taxa de crescimento de um tipo selvagem, organismo não recombinante ou pelo menos cerca de 1/100 a pelo menos aproximadamente igual à taxa de crescimento de um tipo selvagem, organismo não recombinante.

[000158] Em algumas modalidades, a produção de glicerol é reduzido quando comparado com um organismo de tipo selvagem, não recombinante e o organismo produz etanol, a uma taxa de pelo menos cerca de 8-11 mM de glicerol por grama de peso seco celular (DCW) durante o crescimento anaeróbio.

Exemplos

Exemplo 1

[000159] Engenharia *S. cerevisiae* para expressar PKA e PTA Integrado

[000160] Enzimas Fosfocetolase (PHK) de *Bifidobacterium adolescentis*, *Lactobacillus plantarum*, ou *Aspergillus niger* foram integradas no sítio FCY1 de *S. cerevisiae* em combinação com o gene da fosfotranscetilase (PTA) de *Bifidobacterium adolescentis*. As técnicas de modificação genética utilizadas para desenvolver a cepa de

Saccharomyces cerevisiae dependeram de integração dirigida para inserir material genético em sítios específicos e conhecidos dentro do cromossoma da levedura. A abordagem de integração dirigida cria linhagens transgênicas com eventos de integração que são estáveis e fáceis de caracterizar.

[000161] Os cassetes de MX são a ferramenta de engenharia mais utilizada quando uma inserção ou deleção de um elemento genético é desejada em um dado locus cromossômico (Wach A., e outros, *Yeast* 10 (13):... 1793-1808 (1994)). Um cassete de MX reciclável contém um ou mais marcadores que permitem a seleção tanto negativa dominante e (Goldstein, AL, e outros, *Yeast* 15: 507-511 (1999); Hartzog, PE e outros, *Yeast* 22:.. 789-798.. (2005)). O marcador dominante permite a selecção para a modificação e o marcador selecionável contador permite a remoção subsequente do marcador através do sistema Cre-Lox recombinação mediada (Guldener, U., e outros, *Nucleic Acids Research* 24 (13):.. 2519-2524 (1996)) ou a recombinação entre as regiões homólogas que flanqueiam a cassete de duplicados. Porque os marcadores são removidos, eles podem ser reutilizados durante as etapas subsequentes de engenharia e garante que nenhum material genético estranho indesejável permanece na cepa.

[000162] Para criar integrações homozigóticos estáveis dois novos HSV-timidina-quinase (TDK) cassetes MX baseados foram desenvolvidos. Expressão de timidina-quinase em *S. cerevisiae* resulta em sensibilidade ao composto fluoro-deoxiuracila (FUDR). A toxicidade celular de FUDR é dependente da presença de duas enzimas envolvidas no metabolismo da pirimidina: timidina cinase (Tdk) e timidilato-sintetase (thyA). Tdk FUDR converte-se a fluoro-dUMP (F-dUMP), que é um inibidor covalente de thyA e a base para a seleção contadora em uma variedade de organismos eucarióticos (Czako, M., e Marton, L., *Plant Physiol* 104: 1067-. 1071 (1994); Gardiner, DM, e

Howlett, BJ, Curr Genet 45: 249-255 (2004); Khang, CH, e outros, Fungal Genet Biol 42:... 483-492 (2005); Szybalski, W ., Bioessays 14:. 495-500 (1992)).

[000163] O cassete de expressão de HSV-TDK foi fundido de forma independente para dois marcadores selecionáveis dominantes comumente utilizados que conferem resistência às drogas G418 (Kan) ou nourseothricin (Nat) (Goldstein, AL, e outros, Yeast 15:.. 507-511 (1999)). A transformação de ambas os cassetes de expressão duplas, referido como KT-MX e NT-MX, permitiu a seleção positiva para a integração em ambos os cromossomas como ilustrado na Figura 8A). Para cada rodada de engenharia, produtos de amplificação de PCR de regiões a montante e a jusante de acompanhamento do site de destino foram projetados para conter caudas homólogas para ambas os cassetes KT-MX e MX-NT. Ambos os flancos e os marcadores foram transformados seguida por seleção em meio YPD contendo tanto G418 e Nat (Figura 8B).

[000164] Depois de cada etapa de engenharia feita na construção, todos os marcadores foram posteriormente eliminados e/ou substituídos com um cassete de expressão desejada (conjunto Mascoma), resultando em uma cepa livre de marcadores de antibióticos (Figura 9).

[000165] O esquema de integração para cada cepa de construção é mostrado na Figura 10. Os genótipos das cepas podem ser vistos na Tabela 2.

Tabela 2. Cepas de *S. cerevisiae*.

Cepa ID	ID da Montagem Mascoma	Fonte	Descrição da cepa
M2390	Tipo Selvagem	Isolada da fonte comercial	Controle do tipo selvagem
M3293	Antecedentes da redução de glicerol	Construída pela	$\Delta gpd1\Delta gpd2\Delta fdh1\Delta fdh2::adhE$

		Mascoma corporation	
M4408	Planejada M3293 com MA415 expressando PHK de <i>B. adolescentis</i> e PTA	Construída pela Mascoma corporation	$\Delta gpd1\Delta gpd2\Delta fdh1\Delta fdh2::adhE\Delta fcy::$ PHK de <i>B. adolescentis</i> 2/ PTA de <i>B. adolescentis</i>
M4409	Planejada M3293 com MA415 expressando PHK2 de <i>L. plantarum</i> e PTA de <i>B. adolescentis</i>	Construída pela Mascoma corporation	$\Delta gpd1\Delta gpd2\Delta fdh1\Delta fdh2::adhE\Delta fcy::$ PHK2 de <i>L. plantarum</i> /PTA de <i>B. adolescentis</i>
M4410	Planejada M3293 com MA415 expressando <i>A. Niger PHK</i> e PTA de <i>B. adolescentis</i>	Construída pela Mascoma corporation	$\Delta gpd1\Delta gpd2\Delta fdh1\Delta fdh2::adhE\Delta fcy::$ PHK2 de <i>A. niger</i> /PTA de <i>B. adolescentis</i>

EXEMPLO 2Expressão de PKA e PTA resgata o Defeito de Crescimento Anaeróbico na cepa M3293

[000166] O crescimento anaeróbico das cepas que expressam PHK e PTA do Exemplo 1 foi comparado com o crescimento anaeróbico de cepas que não expressam PHK e PTA. M2390, que tem uma via de produção de glicerol completamente anaeróbia, foi utilizada como uma cepa de controle do tipo selvagem. M3293, que contém deleções de ambas GPD1, GPD2, FDH1 e FDH2 e expressão de adhE de *B. adolescentis*, não têm a capacidade de crescer em condições anaeróbicas a menos que acetato seja fornecido. A via heteróloga de fosfocetolase/fosfotranscetilase funcional complementou o defeito crescimento anaeróbico de M3293.

[000167] As células de todas as cepas foram cultivadas durante a noite em meio YPD e inoculado a uma concentração final de 0,1 g/L de DCW em placas de 96 poços contendo 100 μ L de meio YPD. As placas

inoculadas foram deixadas a equilibrar na câmara de anaerobiose durante 20 minutos antes de selar as placas. Como pode ser visto na Figura 11, M3293 não foi capaz de crescer anaerobicamente, no entanto, M4408, M4409, M4410, que contêm uma via de fosfocetolase heteróloga foram capazes de crescer. Estes resultados indicaram que tanto as enzimas fosfocetolase de *B. adolescentis*, *Lactobacillus plantarum*, e *Aspergillus niger* permitiu o crescimento anaeróbio quando expressos em combinação com o gene da fosfotranscetilase de *B. adolescentis*. Os resultados mostrados na Figura 12 indicam que foram apenas pequenas diferenças na taxa de crescimento aeróbio entre M3293 e nas cepas contendo fosfocetolase.

Exemplo 3

Análise de fermentação, utilizando 31% de sólidos de milho Mash

[000168] Em uma outra modalidade, a capacidade de cepas contendo uma deleção de ambos GPD1 e GPD2 expressando PHK e PTA Exemplo 1 a partir de mosto a fermentar milho foi comparada com a capacidade de cepas contendo deleções de ambos GPD1 e GPD2, mas que não expressam PHK e PTA para fermentar puré de milho (M3293). A fermentação foi iniciada por inoculação de levedura para uma concentração inicial de 0,1 g/L de DCW em 4 ml de 30% de puré de sólidos de milho. A fermentação da pasta de milho começou com o oxigênio, tanto no médio e no espaço de cabeça. Crescimento limitado de M3293 era esperado, pois a fermentação anaeróbia não começou e não estava presente acetato. (Durante a fermentação da pasta de milho, houve 0,3-0,5 g/L de etila presente. A presença da via fosfocetolase/fosfotranscetilase crescimento ativado após o fornecimento de oxigênio e de etilo foi esgotado. Todas as três cepas contendo fosfocetolase atingiu um título significativamente maior do que a cepa M3293 de controlo (Figura 13). acumulação de etilo em M4408, M4409 e M4410 (Figura 14) pode ter resultado em um pH mais baixo e

baixa produtividade de etanol.

Exemplo 4

Análise fermentação em meio definido

[000169] Todas as cepas descritas na Tabela 2 foram inoculadas em meio definido sem aminoácidos. Frascos purgados anaeróbias foram preparados com o meio, tal como descrito abaixo. As fermentações foram iniciadas inoculando essas garrafas com as cepas de levedura para uma concentração inicial de 0,1 g de células DCW/L. Após a inoculação, os frascos foram colocados em uma incubadora com agitação mantida a 35°C. As amostras foram retiradas e as concentrações do metabolito foram medidas por análise de HPLC.

Meio Definido

[000170] 1,7 g/L-YNB sem AA sem AS (Sigma)

[000171] 40 g/L de glicose

[000172] 2,3 g/L de ureia ou 5,0 g de sulfato/amônio L

[000173] 6,6 g/L K₂SO₄

[000174] 0,5 g/L de MgSO₄

[000175] 3 g/L de KH₂PO₄

[000176] 1000X Tween-80/ergosterol (concentração final: 20 mg/L

[000177] ergosterol 420 mg/L de Tween)

[000178] Verduyn vitaminas e vestígios; 1 mL/L de cada vez

[000179] A fosfocetolase contendo cepas M4408 e M4410 tinha melhorado em relação ao crescimento M3293 (Figura 15); no entanto, as cepas tinham reduzido a formação de biomassa em relação à cepa de controlo de tipo selvagem, M2390. A formação de etilo observado na fermentação da pasta de milho não foi observada em meio definido. Os títulos de etanol de M4408 e M4410 foram de aproximadamente 9% maior do que M2390 (Figura 16), enquanto que o glicerol foi reduzida em cerca de 2,4 g/L (Figura 17).

Exemplo 5

[000180] Engenharia vetores de expressão de PHK e PTA para *S. cerevisiae*

[000181] Vetores de expressão de fosfoacetolase de *S. cerevisiae* foram criados utilizando o vetor PMU1689. *L. plantarum* PHK1, *L. plantarum* PHK2, *A. niger* PHK, *L. casei* PHK, *B. adolescentis* PHK ou *N. crassa* PHK foram clonados em PMU1689. Para criar, vetores de expressão de fosfoacetolase, os produtos de PCR foram amplificados a partir de moldes de DNA genômico utilizando iniciadores e moldes listados na Tabela 3 e recombinadas com pMU1689 linearizados de tal modo que a ORF de cada gene é imediatamente a jusante do promotor ADH e imediatamente a montante do terminador de PDC1. Esquema dos vetores de expressão PHK pode ser visto nas Figuras 18-23.

[000182] Vetores de expressão de fosfotranscetilase de *S. cerevisiae* foram criadas utilizando o vetor de expressão pMU1771 (Figura 24). O ORF de fosfotranscetilase de *B. adolescentis* foi amplificado a partir de molde de DNA genômico de *B. adolescentis* utilizando iniciadores e moldes indicados na Tabela 3 e recombinadas com pMU1771 linearizados de tal modo que a ORF de cada gene é imediatamente a jusante do promotor TEF2 e imediatamente a montante do terminador ADH3.

Tabela 3. Os modelos de clonagem e vetores de Fosfoacetolase

Organismo Doador	Modelo	Iniciador dianteiro	Iniciador reverso	Vetor	SEQ ID NO
<i>B. adolescentis</i>	<i>B. adolescentis</i> DNA Genômico	gctataccaagcatacaatcaactatctcatatacaatgacgagtcctgttattggcac	TTATAAAACTTTAACTAATAATTAGAGATTAAATCGCTCACTCGTTATCGCCAGCGGTT	pMU1689	49, 50
<i>L. plantarum(1)</i>	<i>L. plantarum</i> Genomic DNA	ctataccaagcatacaatcaactatctcatatacatgacaacagattactcatcacca	AAACTTTAACTAATAATTAGAGATTAAATCGCTTATTTTAAACCCTTCCATTGCCAATC(pMU1689	51, 52
<i>L. plantarum(2)</i>	<i>L. plantarum</i> Genomic DNA	gctataccaagcatacaatcaactatctcatatacaatgagtgaagcaattaaatcaa	AAAACCTTTAACTAATAATTAGAGATTAAATCGCCTACTTCAATGCAGTCCATTTCCAGT	pMU1689	53, 54
<i>N. crassa</i>	<i>N. crassa</i> Genomic DNA	tataccaagcatacaatcaactatctcatatacaatggcggaacacagatcacaattc	AAAACCTTTAACTAATAATTAGAGATTAAATCGCCTACTCGAACTTGGGCAGTTGGTAGA	pMU1689	55, 56
<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i> DNA Genômico	ctataccaagcatacaatcaactatctcatatacatgcttgagaggtcatcgacagg	AACTTTAACTAATAATTAGAGATTAAATCGCTTATTCAAAGGAGGGCATATCATACGTA	pMU1689	57, 58
<i>L. casei</i>	<i>L. casei</i> DNA Genômico	tataccaagcatacaatcaactatctcatatacaatggatacaaaagtaaagactgttg	AAACTTTAACTAATAATTAGAGATTAAATCGCTTACTTGATTGGTTTCCAGGTCCATTC	pMU1689	59, 60

Exemplo 6Análise de componentes da via Fosfocetolase

[000183] Para avaliar componentes da via fosfocetolase, as cepas listadas na Tabela 4 foram inoculadas em frascos contendo 4 ml de meio YP (10g/L de extracto de levedura, 20 g/L de peptona) suplementado com 225g/L maltodextrina. Maltodextrina hidrólise foi iniciada mediante adição de 0,6 AGU/GTS glucoamilase no início da fermentação. Os frascos foram incubados a 32 ° C durante 68 horas e amostrado para análise por HPLC.

Tabela 4. Cepas empregadas no estudo da fermentação.

Cepa	Genótipo
M2390	WT
M3293	$\Delta gpd1::MA0606\Delta gpd2::MA0607\Delta fdh1::MA0608\Delta fdh1::MA0281$
M4408	$\Delta gpd1::MA0606\Delta gpd2::MA0607\Delta fdh1::MA0608\Delta fdh1::MA0281\Delta fcy::MA0449.2$
M4579	$\Delta gpd1::MA0606\Delta gpd2::MA0607\Delta fdh1::MA0608\Delta fdh1::MA0281\Delta fcy::MA0415.3$
M4581	$\Delta gpd1::MA0606\Delta gpd2::MA0607\Delta fdh1::MA0608\Delta fdh1::MA0281\Delta fcy::MA0415.4$
M4582	$\Delta gpd1::MA0606\Delta gpd2::MA0607\Delta fdh1::MA0608\Delta fdh1::MA0281\Delta fcy::MA0449.2$
M4584	$\Delta gpd1::MA0606\Delta gpd2::MA0607\Delta fdh1::MA0608\Delta fdh1::MA0281\Delta fcy::MA0449.3$
M4788	$\Delta gpd1::MA0606\Delta gpd2::MA0607\Delta fdh1::MA0608\Delta fdh1::MA0281\Delta fcy::MA0449.1$
M4789	$\Delta gpd1::MA0606\Delta gpd2::MA0607\Delta fdh1::MA0608\Delta fdh1::MA0281\Delta fcy::MA0449.1$
M4790	$\Delta gpd1::MA0606\Delta gpd2::MA0607\Delta fdh1::MA0608\Delta fdh1::MA0281\Delta fcy::MA0467.6$
M4791	$\Delta gpd1::MA0606\Delta gpd2::MA0607\Delta fdh1::MA0608\Delta fdh1::MA0281\Delta fcy::MA0467.6$
M4792	$\Delta gpd1::MA0606\Delta gpd2::MA0607\Delta fdh1::MA0608\Delta fdh1::MA0281\Delta fcy::MA0434.6$

Cepa	Genótipo
M4793	$\Delta gpd1::MA0606\Delta gpd2::MA0607\Delta fdh1::MA0608\Delta fdh1::MA0281\Delta fcy::MA0434.6$
M4794	$\Delta gpd1::MA0606\Delta gpd2::MA0607\Delta fdh1::MA0608\Delta fdh1::MA0281\Delta fcy::MA0435.1$

[000184] M2390 é um tipo de levedura selvagem convencional. M3293 contém deleção de ambos os genes da glicerol-3-fosfato desidrogenase (GPD1 e GPD2), ambos os genes de desidrogenase de formiato (FDH1 e FDH2), e expressão da álcool/aldeído desidrogenase bifuncional de *B. adolescentis*. Esta cepa cresce mal em condições anaeróbicas e só é capaz de produzir um título de 42 g/L de etanol enquanto que M2390 foi capaz de atingir 113 g/L de etanol (figura 25).

[000185] A adição de componentes da via fosfocetolase M3293 permitido para a melhoria da produção de etanol. A expressão de ambos PHK de *B. adolescentis* e *L. casei* em combinação com o gene de PTA de *B. adolescentis* resultou na produção de 60,7 e 72,3 g/L, respectivamente (Figura 25), indicando que a via complementa parcialmente o defeito observado em M3293. Expressão de PHK, e genes PTA e ACK de *B. adolescentis* resultou na produção de 92 g/L de etanol. Esta combinação produziu títulos que eram significativamente mais elevados do que quando o PHK e PTA de *B. adolescentis* foram as únicas adições.

[000186] Uma descrição dos cassetes usados para criar as cepas é visto abaixo e nas Figuras 26-34. As cepas foram criadas tal como descrito, por exemplo, no Exemplo 1.

MA0281

Fragmento	Iniciadores	Modelo	Tamanho Esperado
FDH2 Flanco 5'	X16096/ X17243	M2390 gDNA	503bp
PFK pro/ HXT2 ter	X16738/ X14897	pMU2745	4233bp
TPI pro/ FBA1 ter	X14896/ X16744	pMU2746	3683bp
FDH2 Flanco 3'	X17244/ X11845	M2390 gDNA	1939bp

MA467.6		PHK	
Fragmento	Iniciadores	Modelo	Tamanho Esperado
FCY Flanco 5'	X21754/ X21736	M2390 gDNA	2049bp
ADH1pro/ PDC1ter	X21735/ X18847	pMU3397(PHK)	3728bp
FCY Flanco 3'	X18846/ X18869	M2390 gDNA	2166bp
MA449.2		4PTA/ 2PHK	
Fragmento	Iniciadores	Modelo	Tamanho Esperado
FCY Flanco 5'	X21754/ X19552	M2390 gDNA	2049bp
TEF2pro/ ADH3ter	X19551/ X19513	pMU3399(PTA)	2671bp
ADH1pro/ PDC1ter	X19514/ X19360	pMU3397(PHK)	3728bp
TPIpro/ FBA1ter	X19361/ X19903	pMU3402(PTA)	2621bp
FCY Flanco 3'	X19902/ X18869	M2390 gDNA	2166bp
MA449.3		2PTA/ 2PHK/ 2ACK	
Fragmento	Iniciadores	Modelo	Tamanho Esperado
FCY Flanco 5'	X21754/ X19552	M2390 gDNA	2049bp
TEF2pro/ ADH3ter	X19551/ X19513	pMU3399(PTA)	2671bp
ADH1pro/ PDC1ter	X19514/ X19360	pMU3397(PHK)	3728bp
TPIpro/ FBA1ter	X19361/ X19903	pMU3407(ACK)	2180bp
FCY Flanco 3'	X19902/ X18869	M2390 gDNA	2166bp
MA435.1		PHK/ ACK	
Fragmento	Iniciadores	Modelo	Tamanho Esperado
FCY Flanco 5'	X21754/ X21736	M2390 gDNA	2049bp
ADH1pro/ PDC1ter	X21735/ X19855	pMU3397(PHK)	3728bp
TPIpro/ FBA1ter	X19854/ X18861	pMU3407(ACK)	2180bp
FCY Flanco 3'	X18860/ X18869	M2390 gDNA	2166bp

MA415.4		4PTA	
Fragmento	Iniciadores	Modelo	Tamanho Esperado
FCY Flanco 5'	X21754/ X19552	M2390 gDNA	2049bp
TEF2pro/ ADH3ter	X19551/ X19513	pMU3399(PTA)	2671bp
ADH1pro/ PDC1ter	X19514/ X18955	pMU3401(PTA)	2921bp
FCY Flanco 3'	X19950/ X18869	M2390 gDNA	2166bp
MA449.1		4PTA/ 2ACK	
Fragmento	Iniciadores	Modelo	Tamanho Esperado
FCY Flanco 5'	X21754/ X19552	M2390 gDNA	2049bp
TEF2pro/ ADH3ter	X19551/ X19513	pMU3399(PTA)	2671bp
ADH1pro/ PDC1ter	X19514/ X19360	pMU3401(PTA)	2921bp
TP1pro/ FBA1ter	X19361/ X19903	pMU3407(ACK)	2180bp
FCY Flanco 3'	X19902/ X18869	gDNA	2166bp
MA434.6		ACK	
Fragmento	Iniciadores	Modelo	Tamanho Esperado
FCY Flanco 5'	X21754/ X18859	M2390 gDNA	2049bp
TP1pro/ FBA1ter	X18858/ X18861	pMU3407(ACK)	2180bp
FCY Flanco 3'	X18860/ X18869	M2390 gDNA	2166bp
MA415.3		Lcasei PHK	
Fragmento	Iniciadores	Modelo	Tamanho Esperado
FCY Flanco 5'	X21754/ X19552	M2390 gDNA	2049bp
TEF2pro/ ADH3ter	X19551/ X19513	pMU3399 (PTA)	2671bp
ADH1pro/ PDC1ter	X19514/ X18955	pMU3416 (PHK)	3632bp
FCY Flanco 3'	X19950/ X18869	M2390 gDNA	2166bp

[000187] Todos os documentos aqui citados, incluindo artigos de periódicos ou resumos, publicações ou US ou pedidos de patentes estrangeiras correspondentes, emitidos ou patentes estrangeiras, ou quaisquer outros documentos, são cada totalmente incorporados por

referência, incluindo todos os dados, tabelas, figuras e texto apresentado nos documentos citados.

[000188] Os especialistas na técnica reconhecerão, ou serão capazes de determinar usando não mais do que experimentação de rotina, muitos equivalentes das modalidades específicas do invento aqui descrito. Tais equivalentes destinam-se a ser englobados pelas seguintes reivindicações.

REIVINDICAÇÕES

1. Microrganismo recombinante, caracterizado pelo fato de que é uma levedura que compreende:

(a) um ácido nucleico heterólogo que codifica uma fosfocetolase;

(b) pelo menos um ácido nucleico heterólogo codificando uma enzima em uma via de produção de acetil CoA;

(c) um ácido nucleico heterólogo codificando uma acetaldeído-álcool desidrogenase bifuncional; e,

(d) regulação negativa de uma enzima nativa em uma via de produção de glicerol;

em que a referida enzima na via de produção de acetil-CoA é uma fosfotransacetilase e/ou uma acetato quinase; e

em que a referida enzima nativa na via de produção de glicerol é uma glicerol-3-fosfato desidrogenase (GPD) e/ou um glicerol-3-fosfato fosfatase (GPP); que é codificada por um polinucleotídeo *gpd1*, um polinucleotídeo *gpd2*, e combinações dos mesmos;

em que a referida fosfocetolase é de *A. niger*, *N. crassa*, *L. casei*, *L. plantarum*, *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. gallicum*, *B. animalis*, *L. pentosum*, *L. acidophilus*, *P. chrysogenum*, *A. nidulans*, *A. clavatus*, *L. mesenteroides*, *O. oenii*, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 94, ou SEQ ID NO: 102;

em que a referida acetaldeído-álcool desidrogenase bifuncional é de SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 90, ou SEQ ID NO: 98;

em que a referida fosfotransacetilase é de *B. adolescentis*, *C. cellulolyticum*, *C. phytofermentans*, *B. bifidum*, *B. animalis*, *L. mesenteroides*, *O. oenii*, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO:

80, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, ou SEQ ID NO: 96;

em que a referida e/ou um acetato quinase é de *B. adolescentis*, *C. cellulolyticum*, *C. phytofermentans*, *L. mesenteroides*, *O. oenii*, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 92, ou SEQ ID NO: 100;

em que o referido microrganismo é do gênero *Saccharomyces*.

2. Microrganismo recombinante, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o referido microrganismo compreende ainda pelo menos uma enzima regulada positivamente adicional;

em que a referida enzima regulada positivamente é uma transaldolase de SEQ ID NO: 36, a referida enzima regulada positivamente é uma transcetolase de SEQ ID NO: 38, a referida enzima regulada positivamente é uma ribose-5-P isomerase de SEQ ID NO: 40 ou a referida enzima regulada positivamente é uma ribulose-5-P 3-epimerase de SEQ ID NO: 42.

3. Microrganismo recombinante, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a regulação negativa da aldeído desidrogenase codificada por um polinucleotídeo ALD2 nativo de *S. cerevisiae*, um polinucleotídeo ALD3 nativo de *S. cerevisiae*, um polinucleotídeo ALD4 nativo de *S. cerevisiae*, um polinucleotídeo ALD5 nativo de *S. cerevisiae*, um polinucleotídeo ALD6 nativo de *S. cerevisiae* ou uma combinação dos mesmos.

4. Microrganismo recombinante, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a regulação positiva de aldeído desidrogenase, em que a aldeído desidrogenase é de SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22,

SEQ ID NO: 24 ou SEQ ID NO: 26.

5. Microrganismo recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a regulação negativa do polinucleotídeo FDH1 da formiato desidrogenase nativa de *S. cerevisiae*, do polinucleotídeo FDH2 da formiato desidrogenase nativa de *S. cerevisiae* ou a combinação dos mesmos.

6. Microrganismo recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a regulação positiva de uma piruvato formiato liase de SEQ ID NO: 48 ou uma enzima de ativação de piruvato formiato liase de SEQ ID NO: 46.

7. Microrganismo recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que o referido microrganismo produz etanol com um rendimento mais alto do que um microrganismo idêntico sem a modificação das referidas modificações genéticas.

8. Microrganismo recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que o referido microrganismo é *Saccharomyces cerevisiae*.

9. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende um microrganismo recombinante, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 8, e uma matéria-prima contendo carbono.

10. Método para produzir etanol, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) fornecer o microrganismo recombinante, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 8, ou a composição, como definida na reivindicação 9;

(b) cultivar o referido microrganismo recombinante na presença de uma matéria-prima contendo carbono por tempo suficiente

para produzir etanol, opcionalmente.

11. Co-cultura, caracterizada pelo fato de que compreende pelo menos duas células hospedeiras em que:

(a) uma das células hospedeiras compreende um microrganismo recombinante, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 8; e,

(b) outra célula hospedeira que é geneticamente distinta de (a).

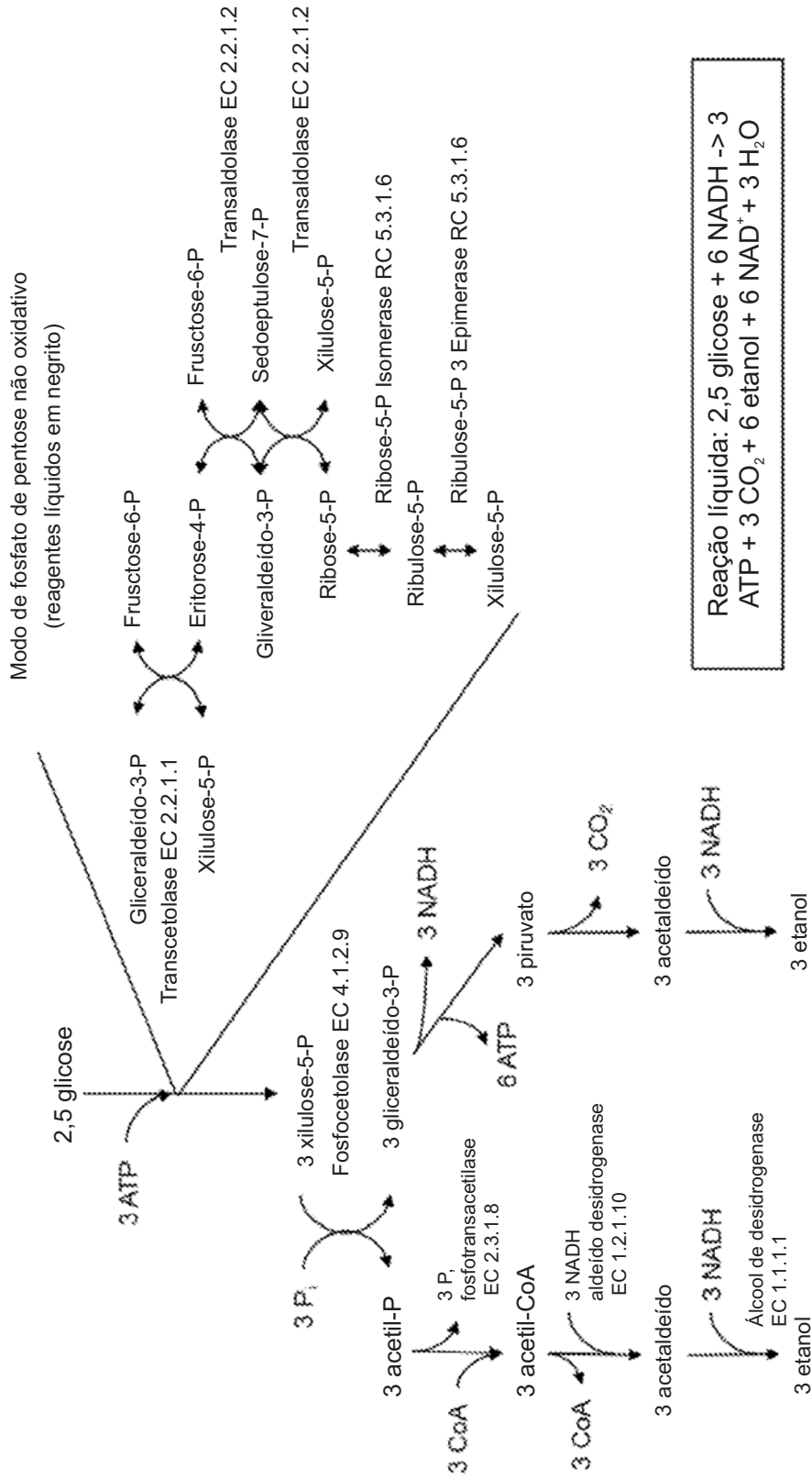


FIG. 1

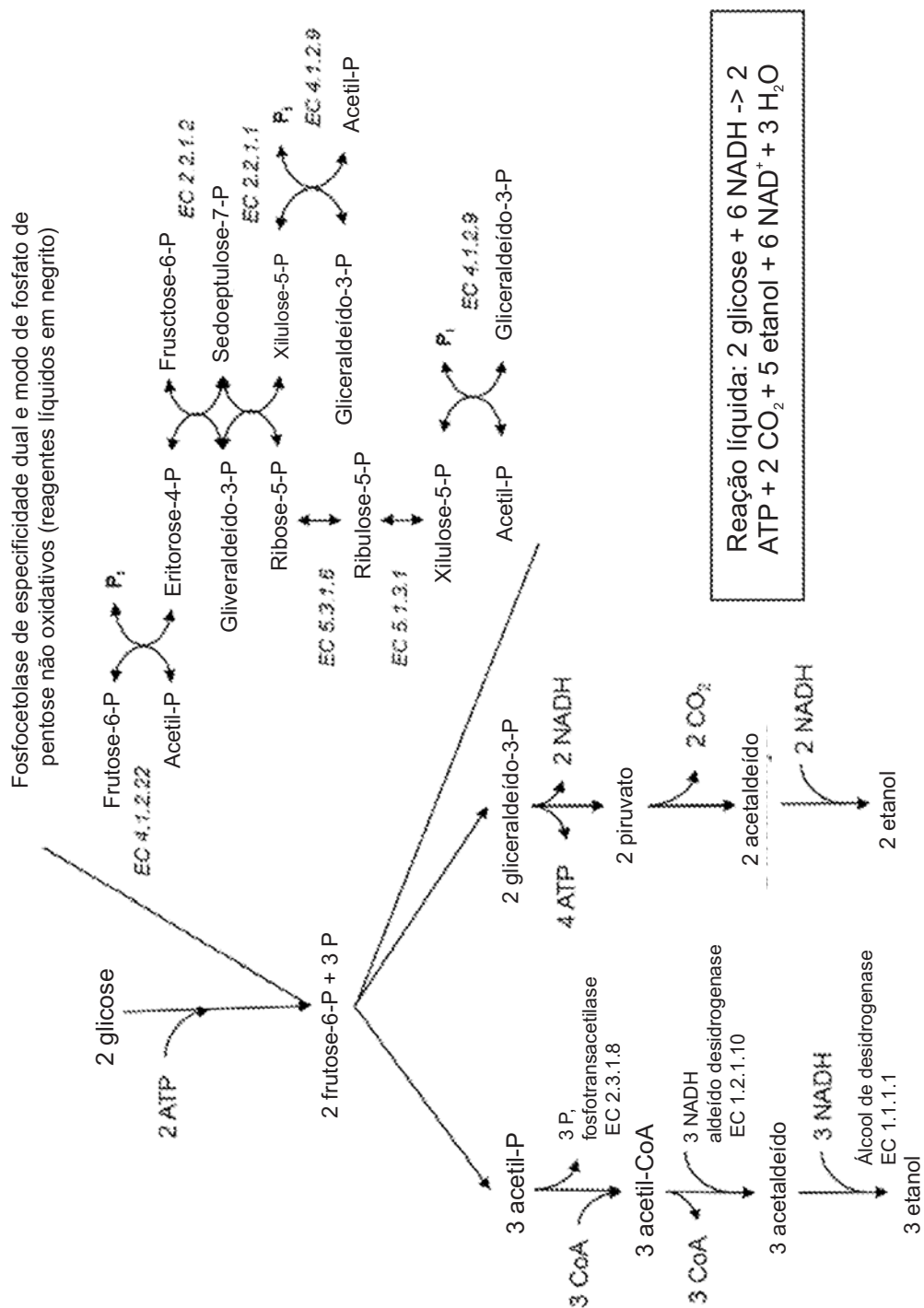


FIG. 2

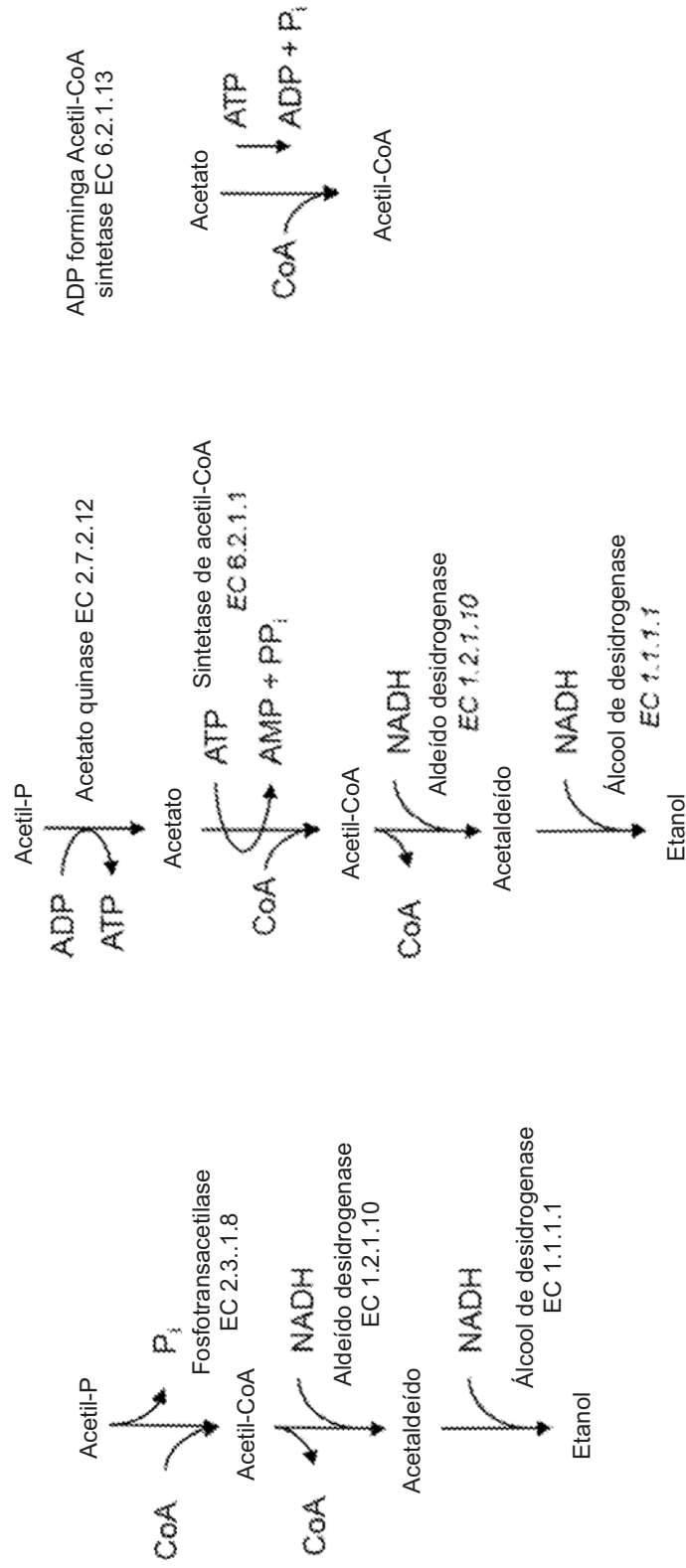


FIG. 3

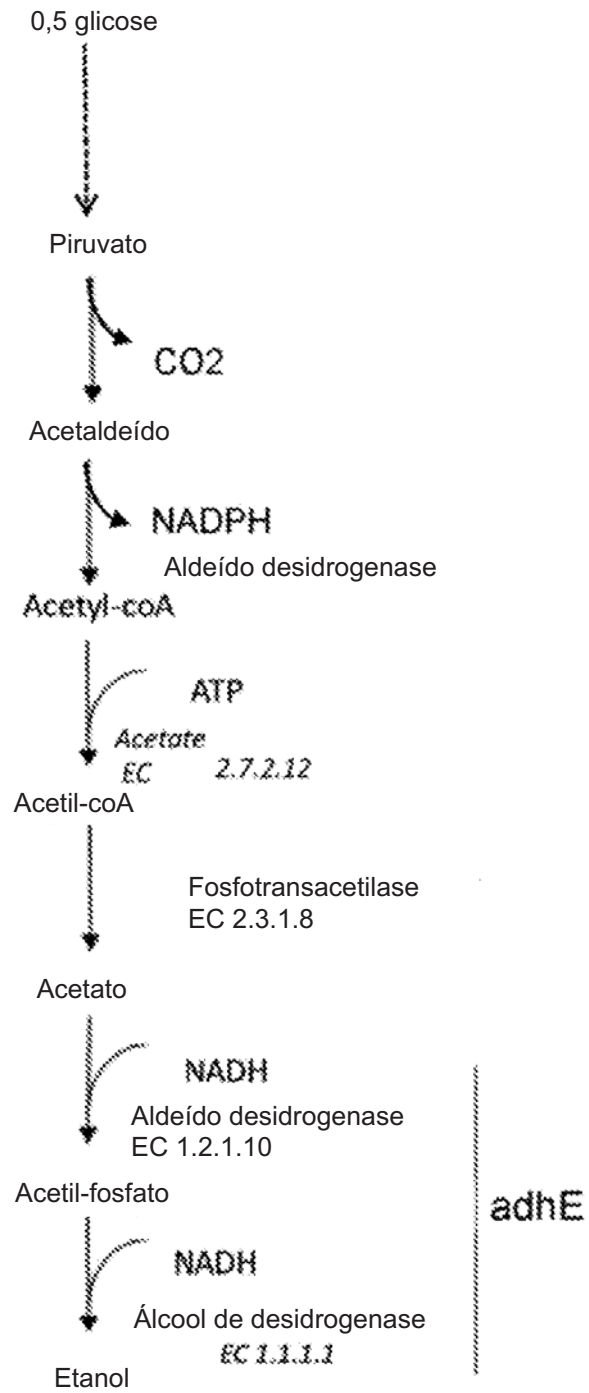


FIG. 4

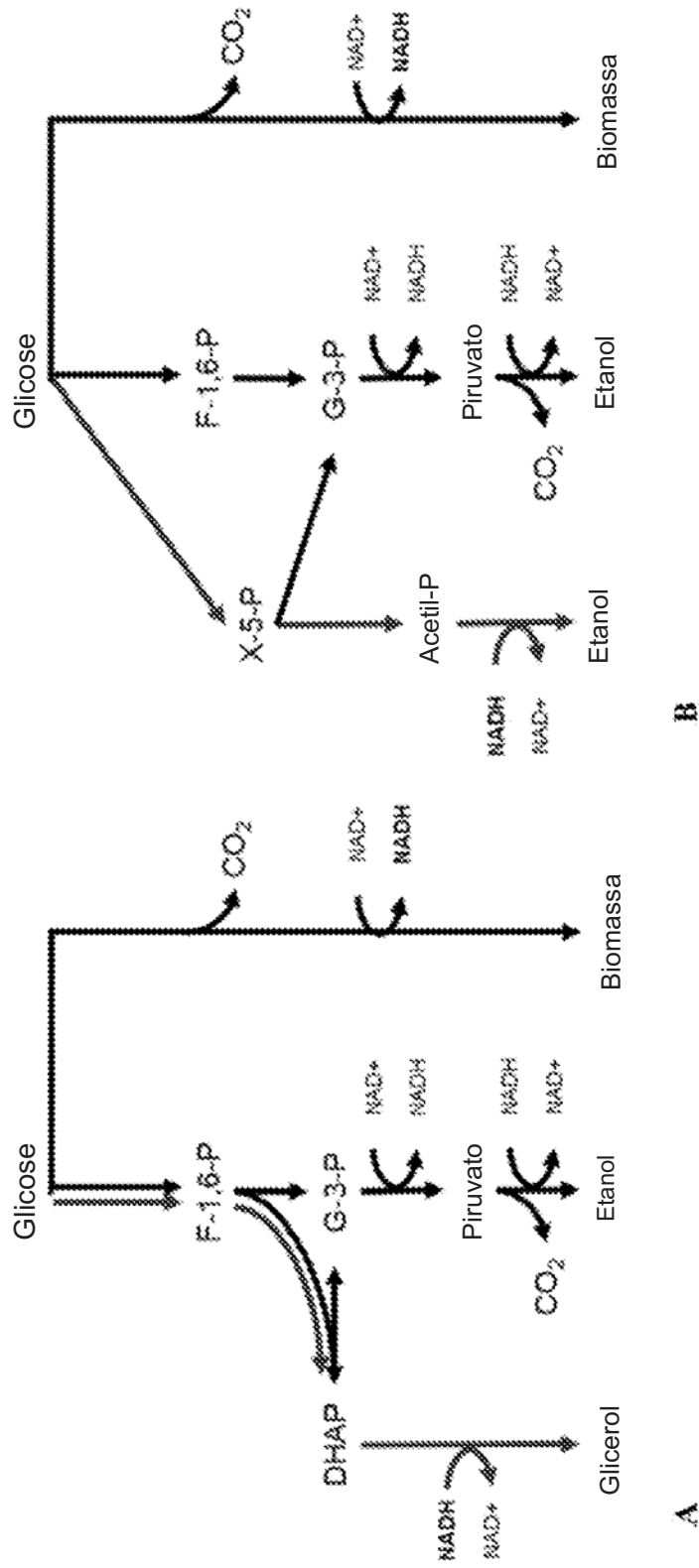


FIG. 5

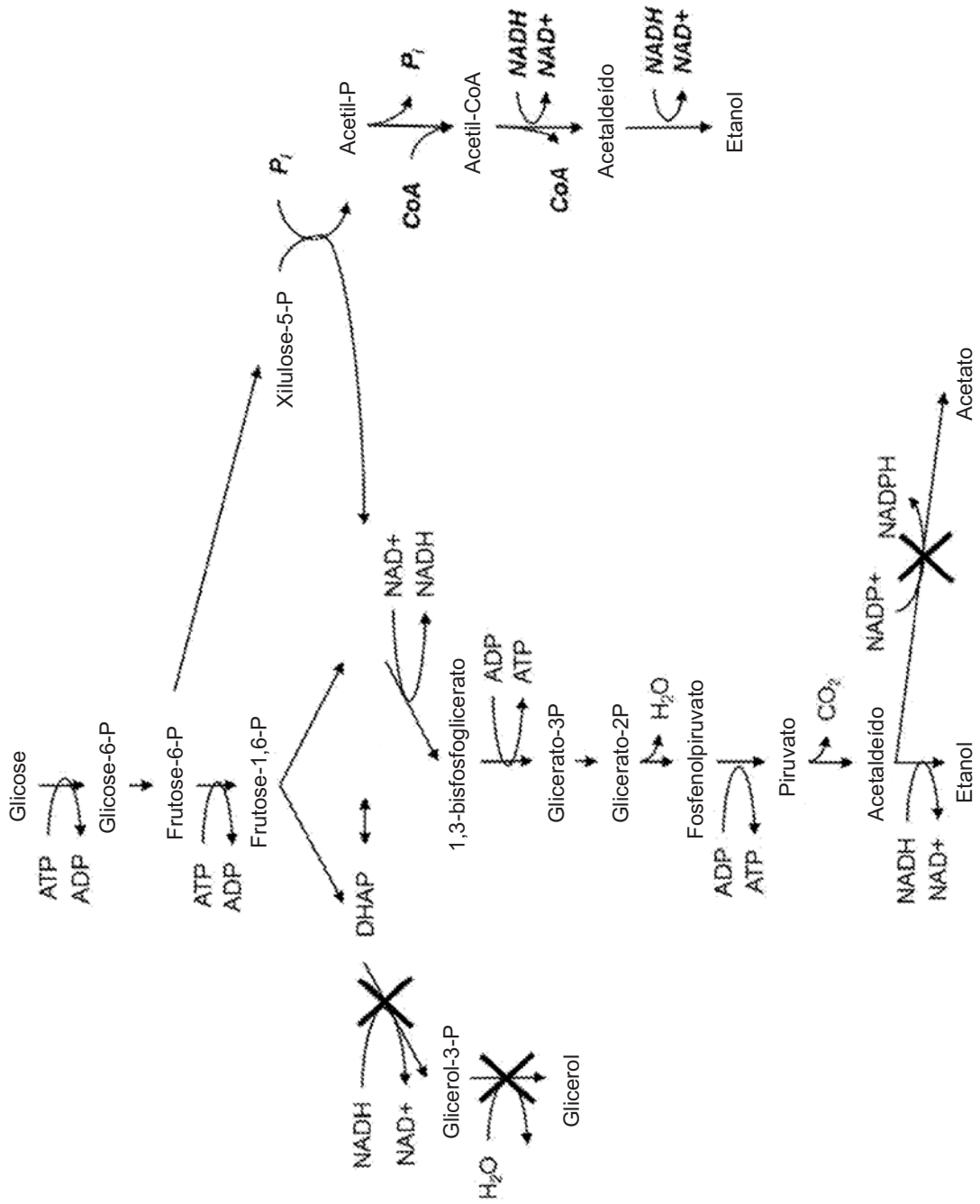


FIG. 6



FIG. 7

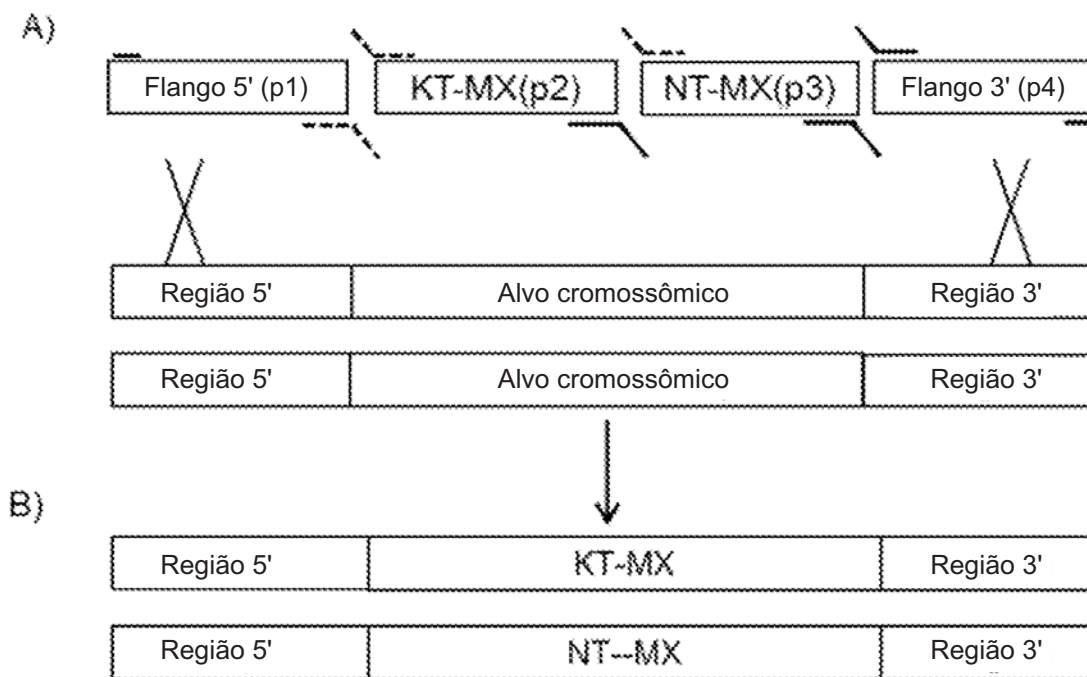


FIG. 8

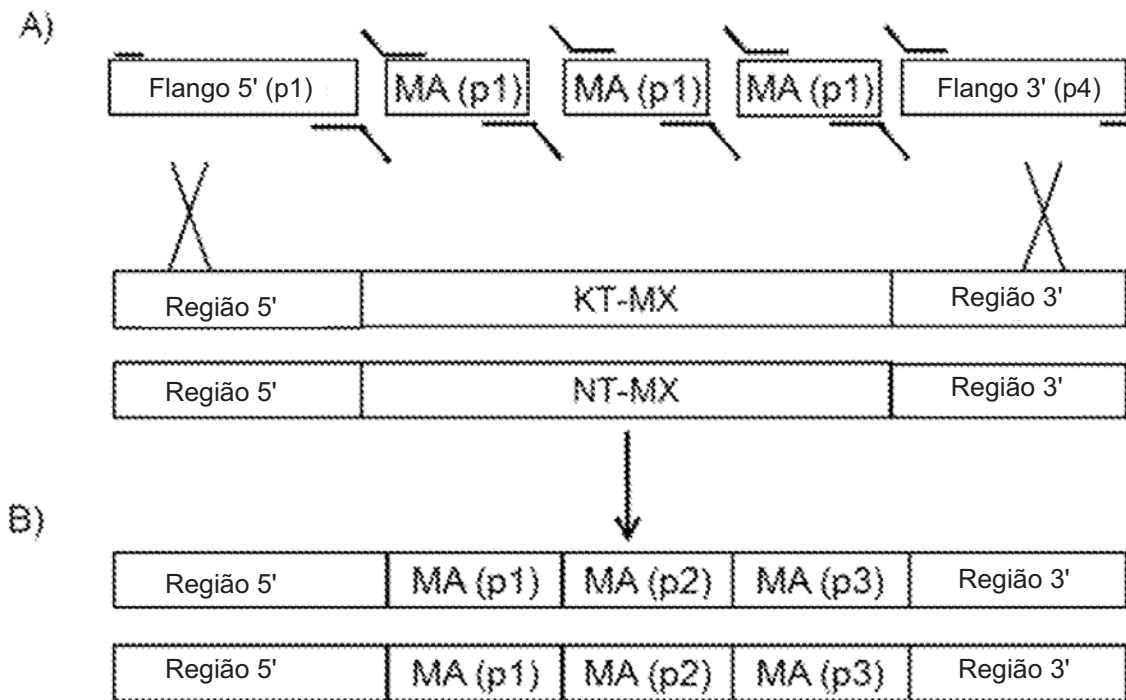


FIG. 9

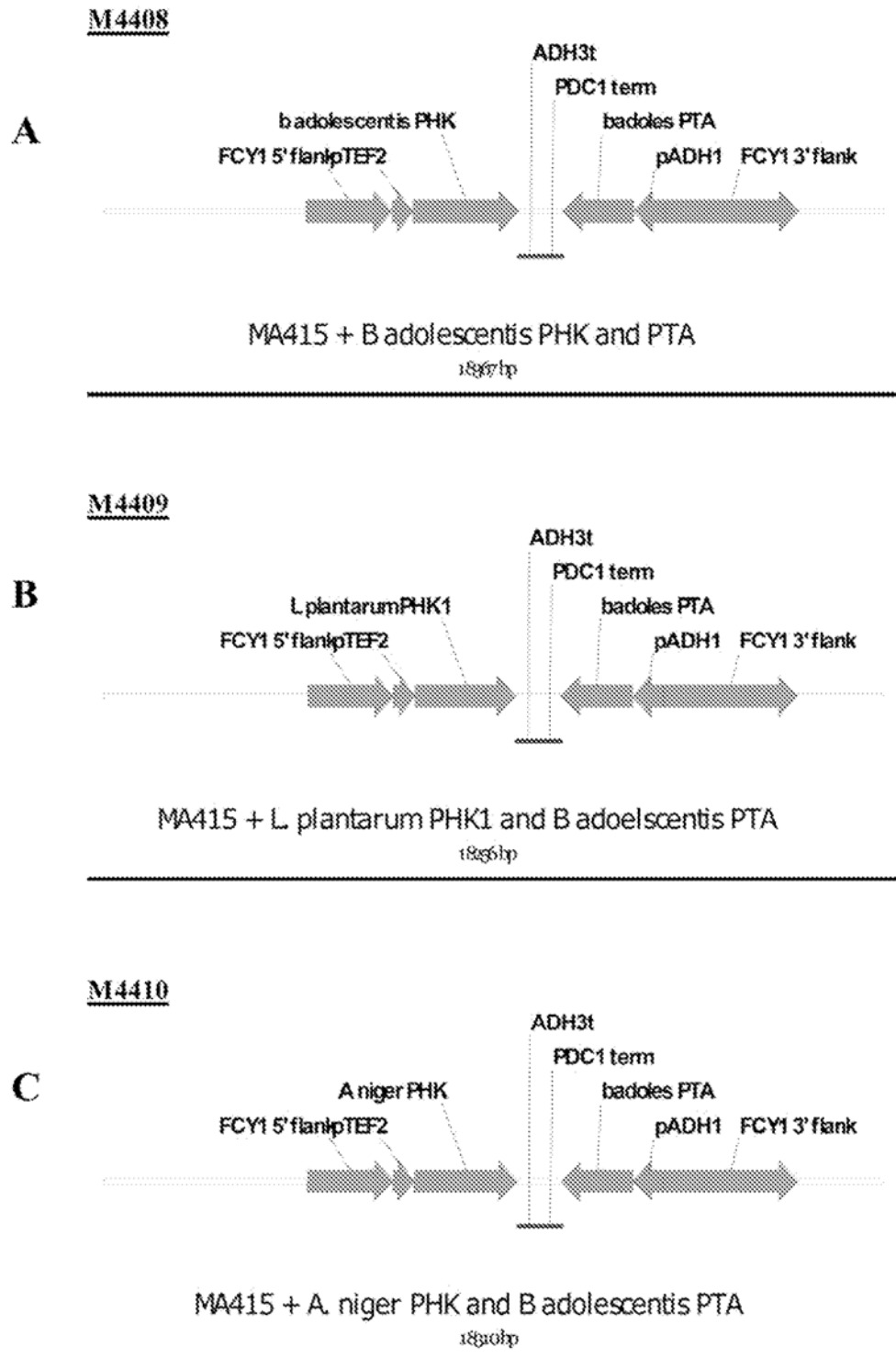
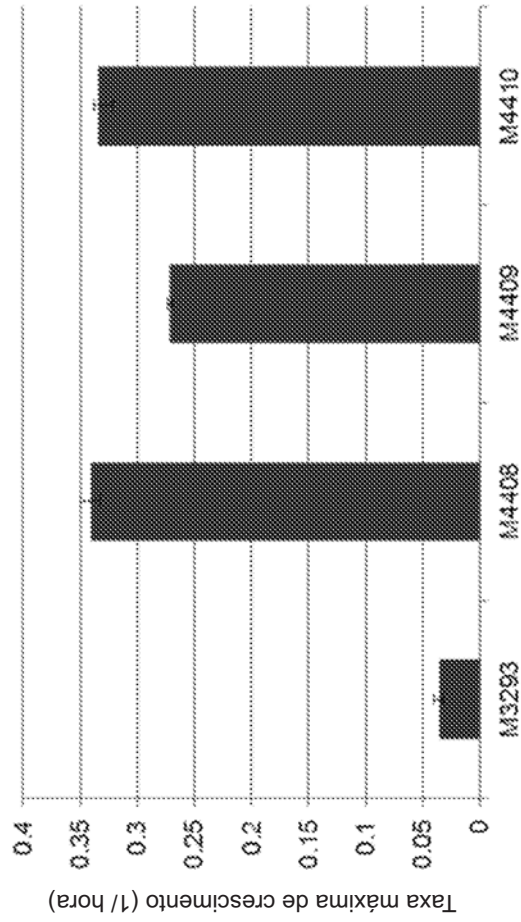


FIG. 10



M3293	Δ gpd1 Δ gpd2 Δ fdh1 Δ fdh2::adhE
M4408	M3292 + <i>B. adolescentis</i> PHK with <i>adolescentis</i> PTA
M4409	M3293 + <i>L. plantarum</i> PHK2 with <i>B. adolescentis</i> PTA
M4410	M3293 + <i>A. niger</i> PHK with <i>B. adolescentis</i> PTA

FIG. 11

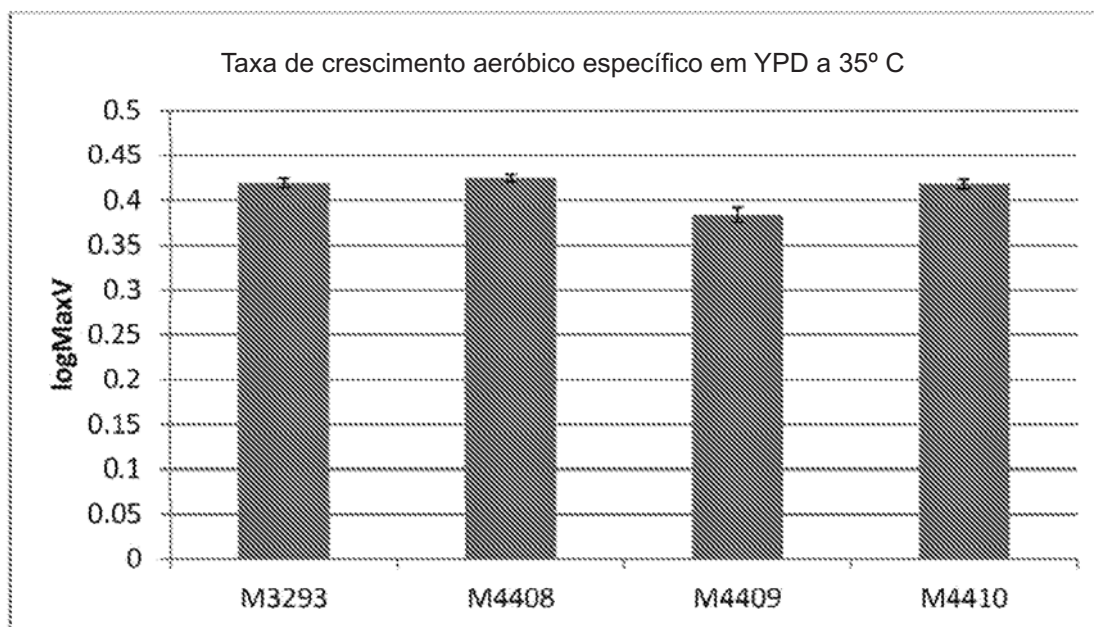


FIG. 12

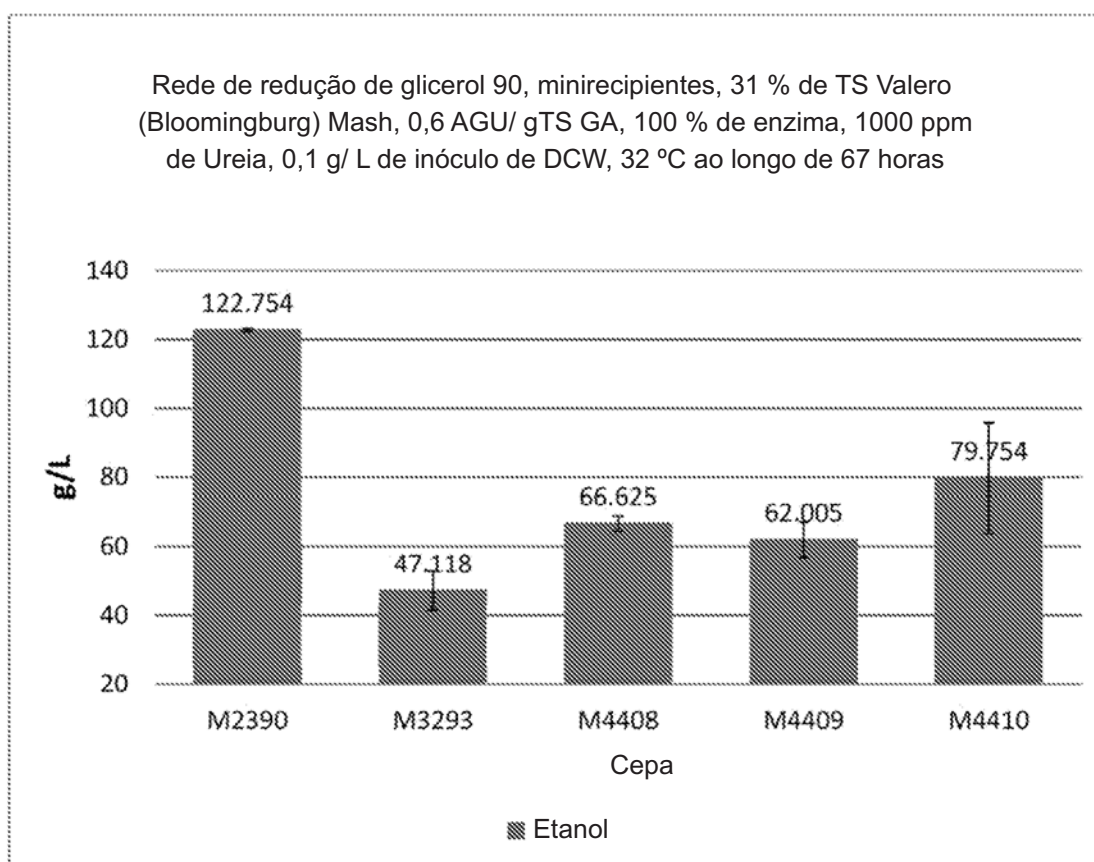


FIG. 13

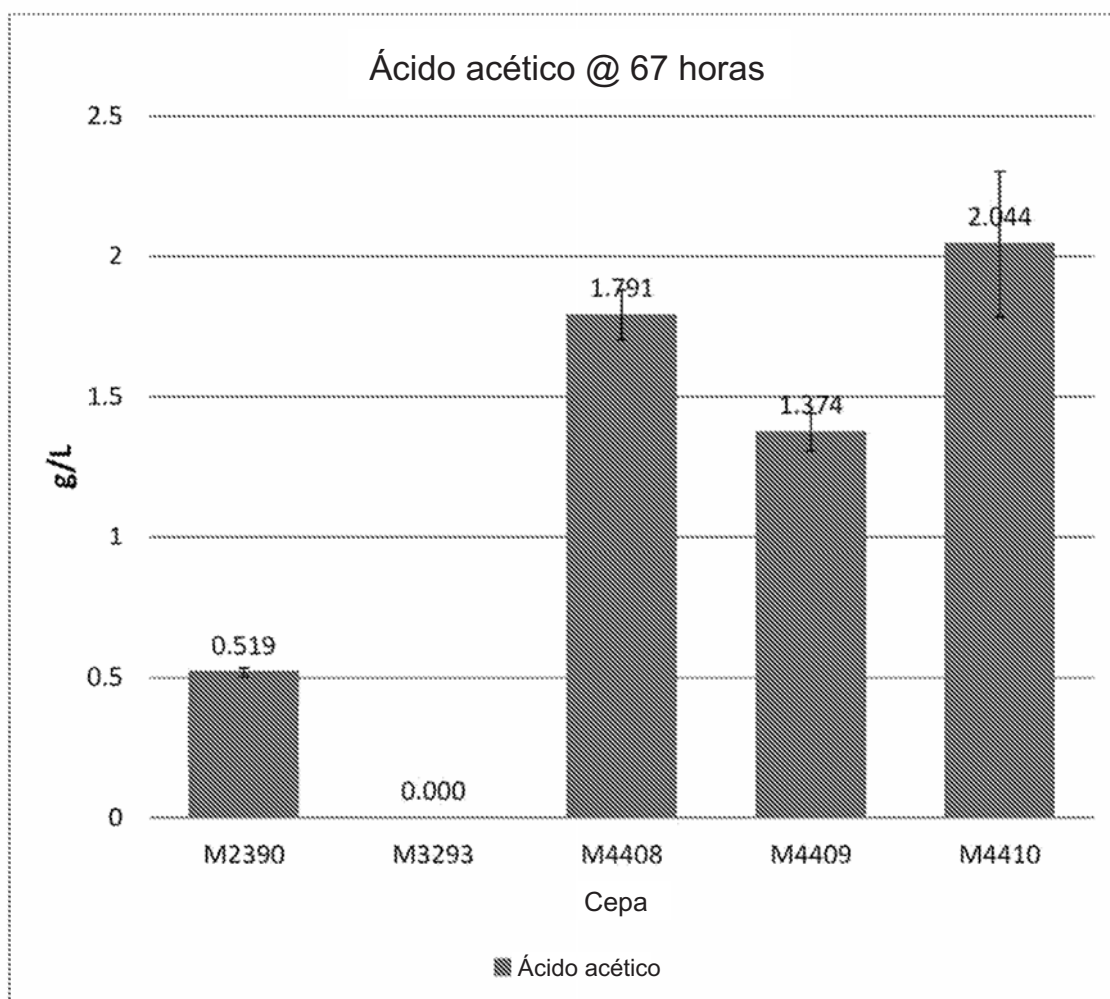


FIG. 14

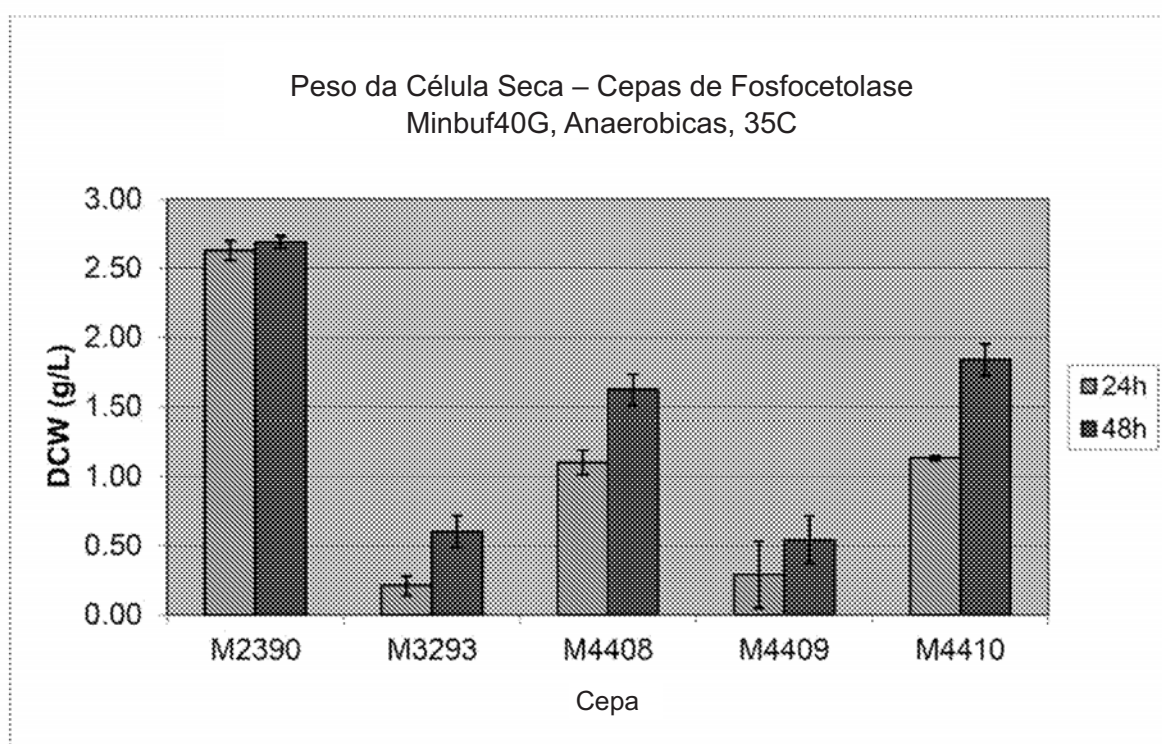


FIG. 15

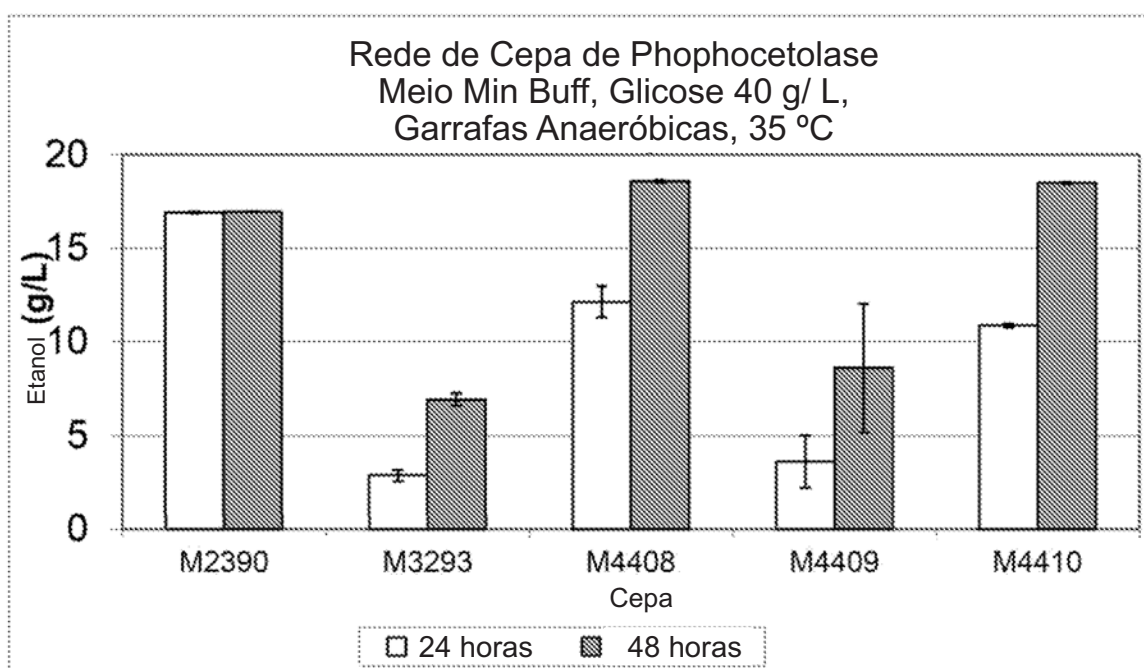


FIG. 16

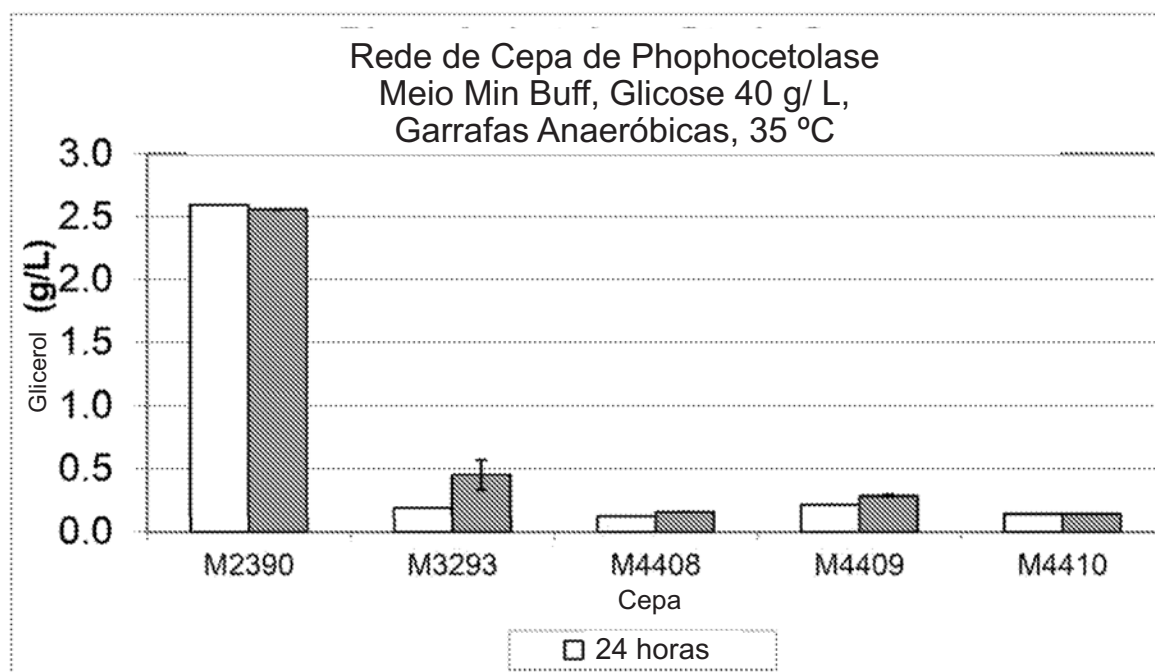


FIG. 17

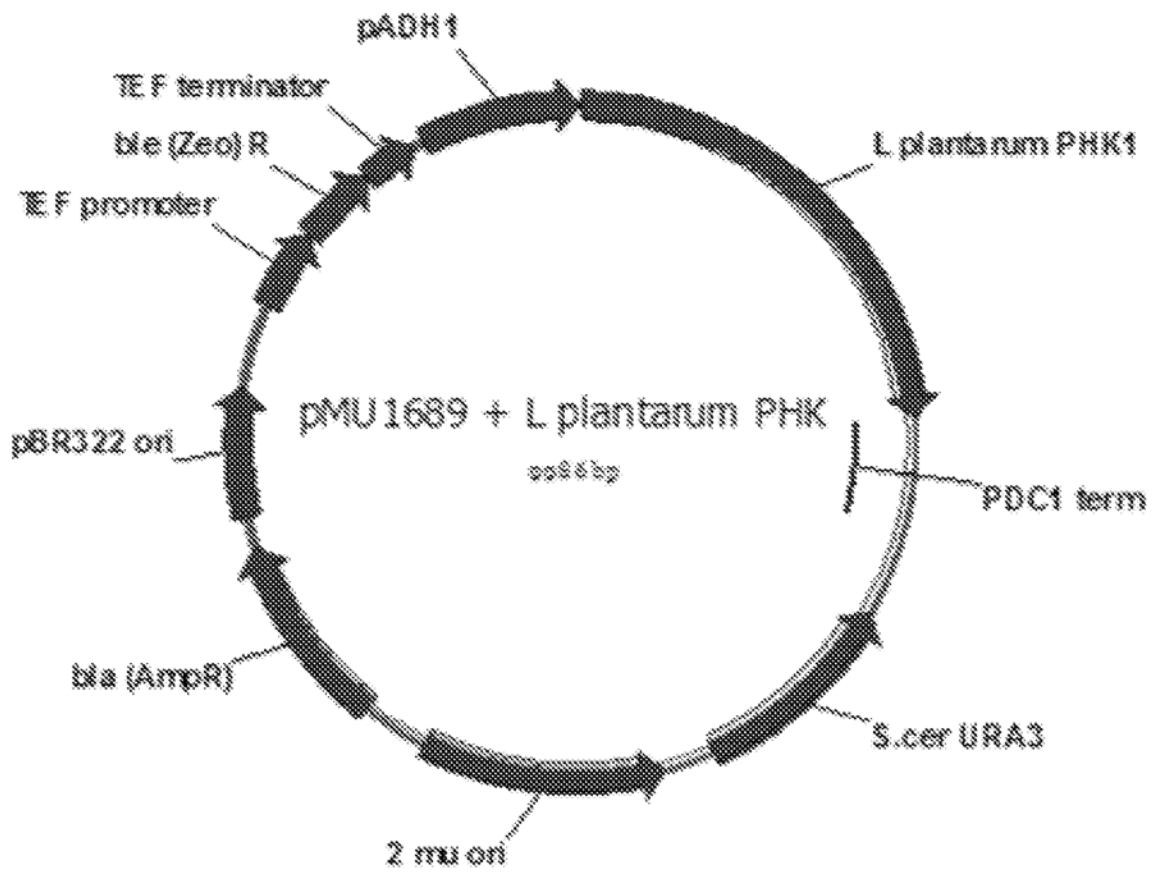
Cassete de expressão de PHK1 de *L. plantarum*

FIG. 18

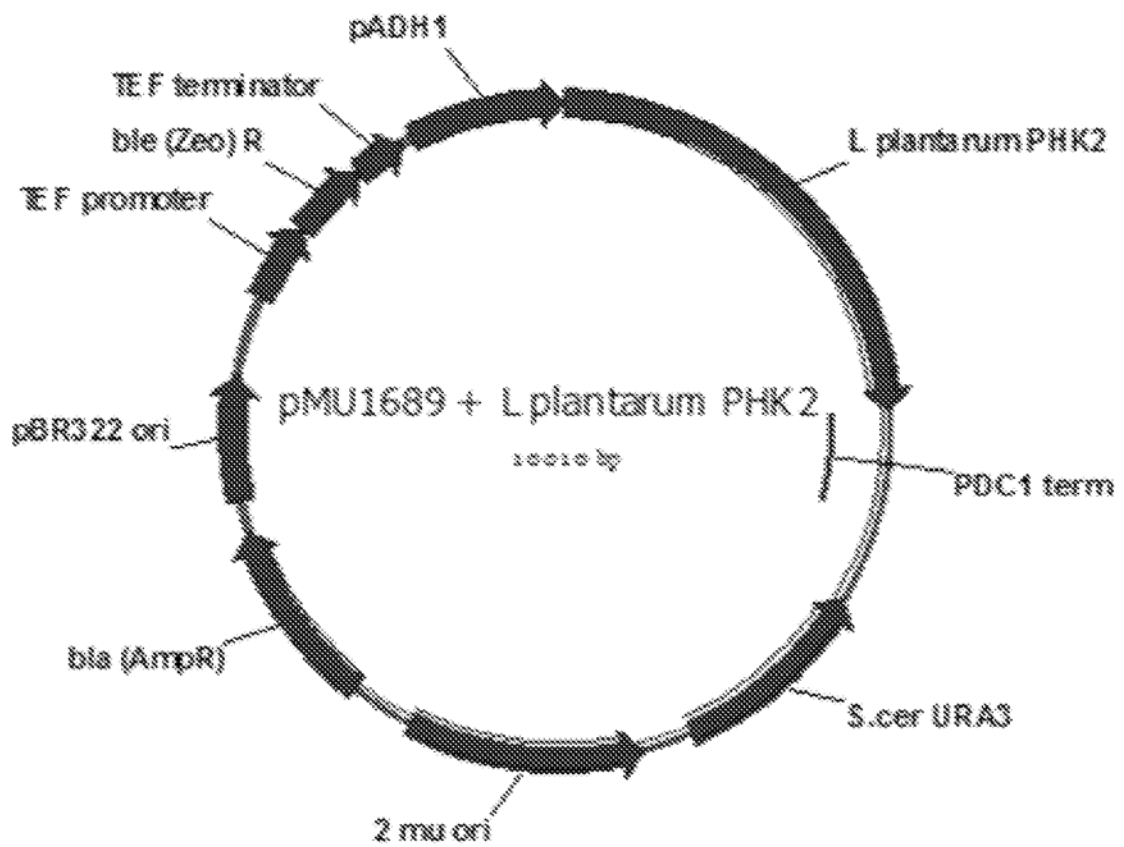
Cassete de expressão de PHK2 de *L. plantarum*

FIG. 19

PHK de A. niger

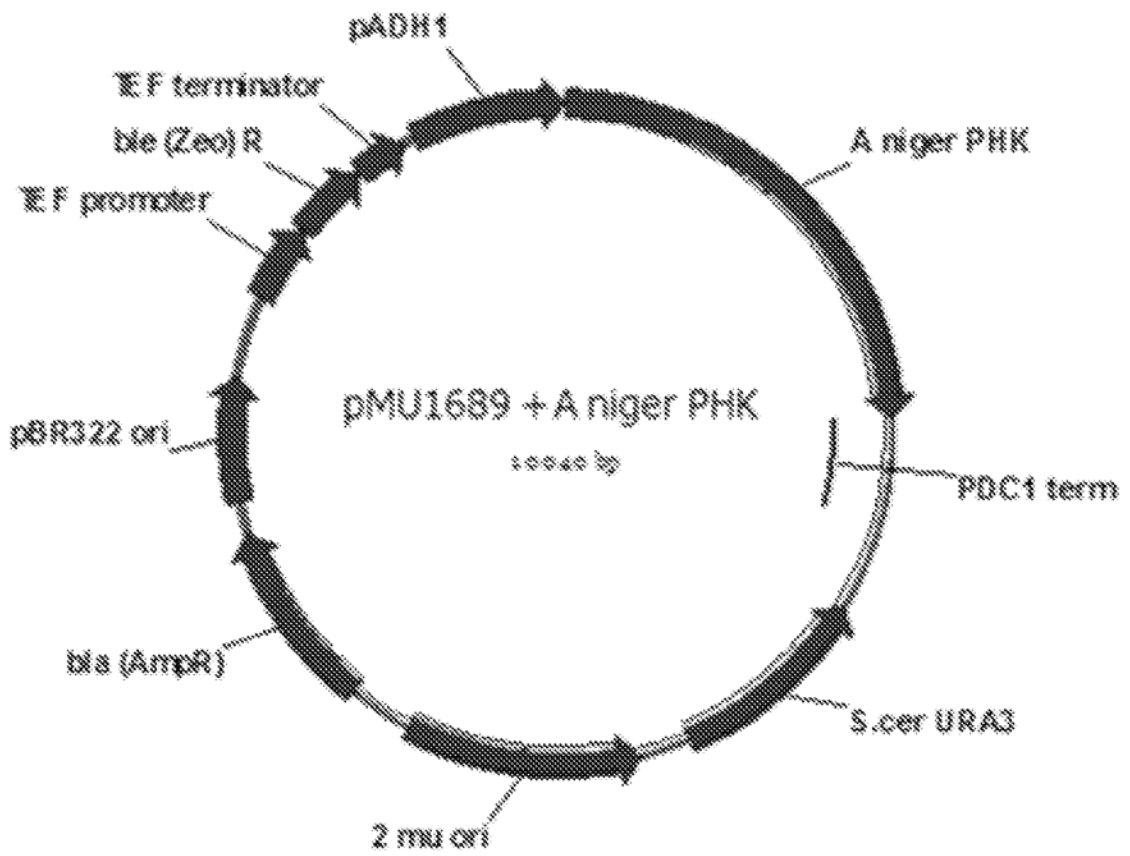


FIG. 20

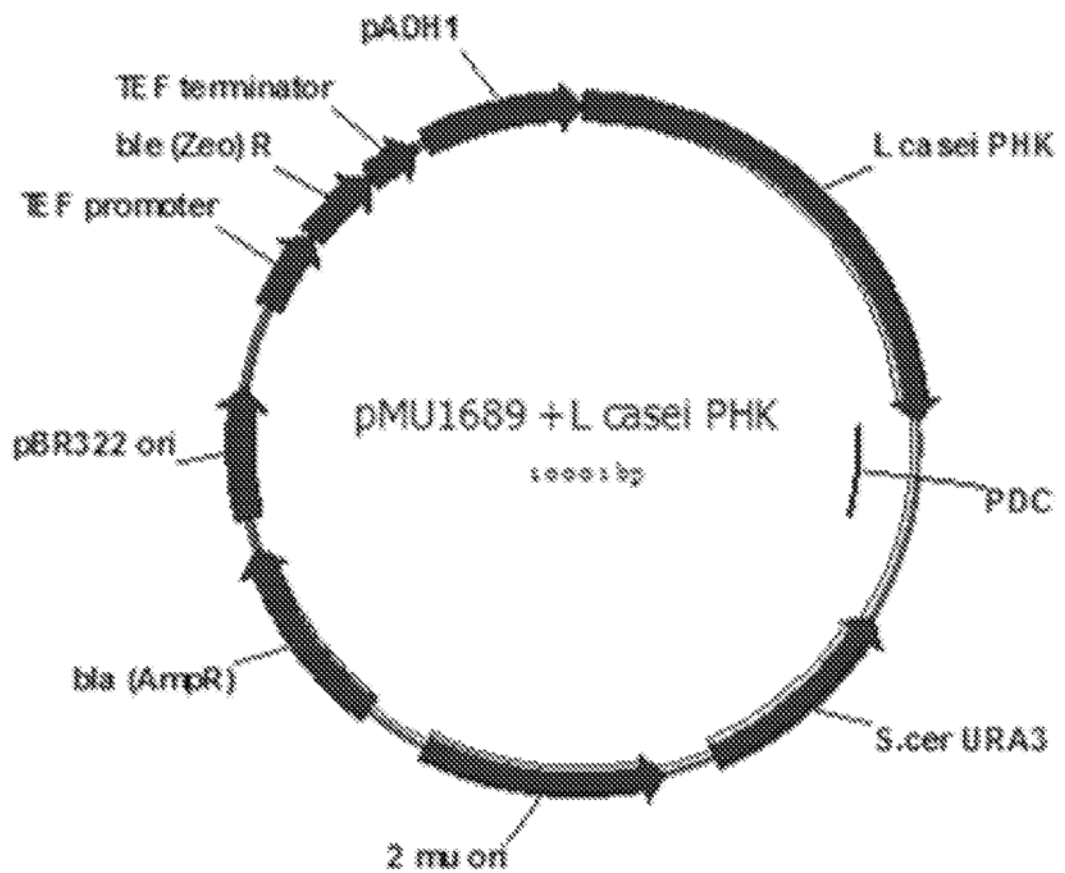
Cassete de expressão de PHK de *L. casei*

FIG. 21

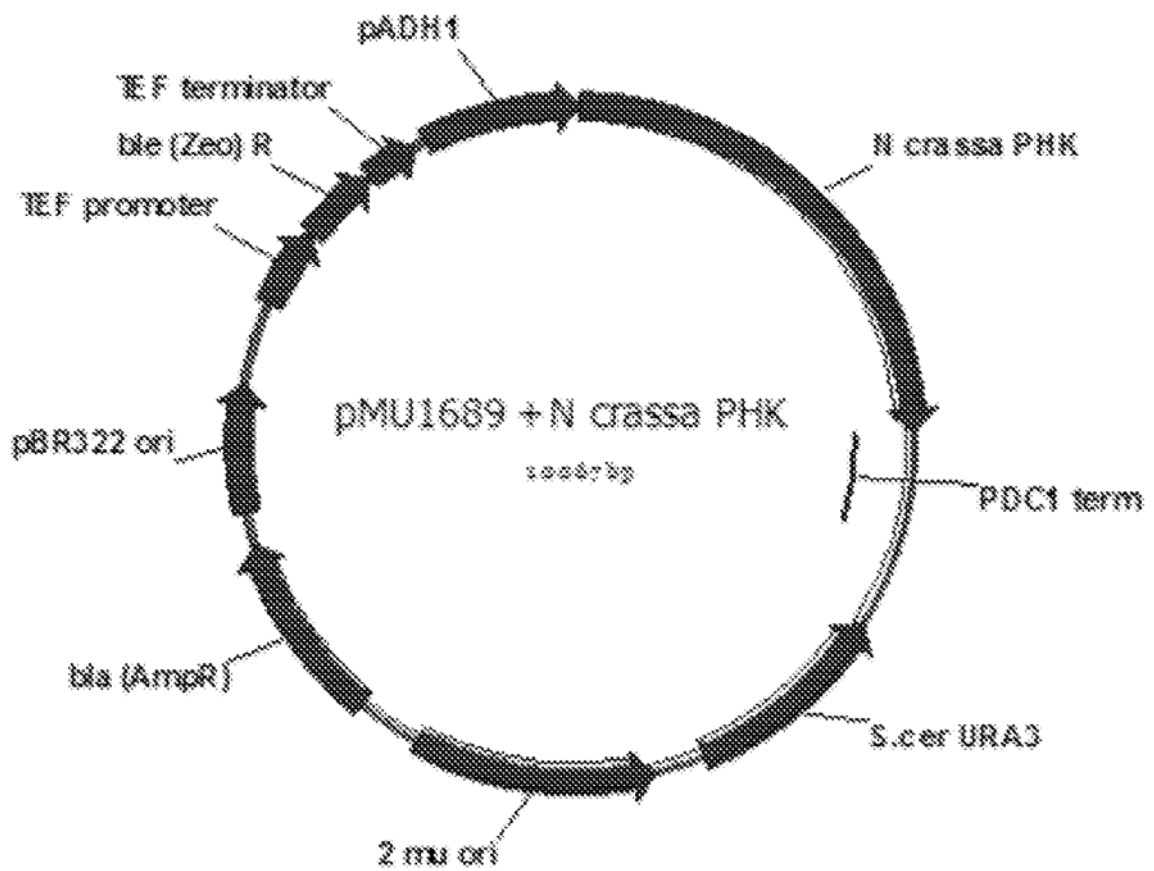
Cassete de expressão de PHK de *N. crassa*

FIG. 22

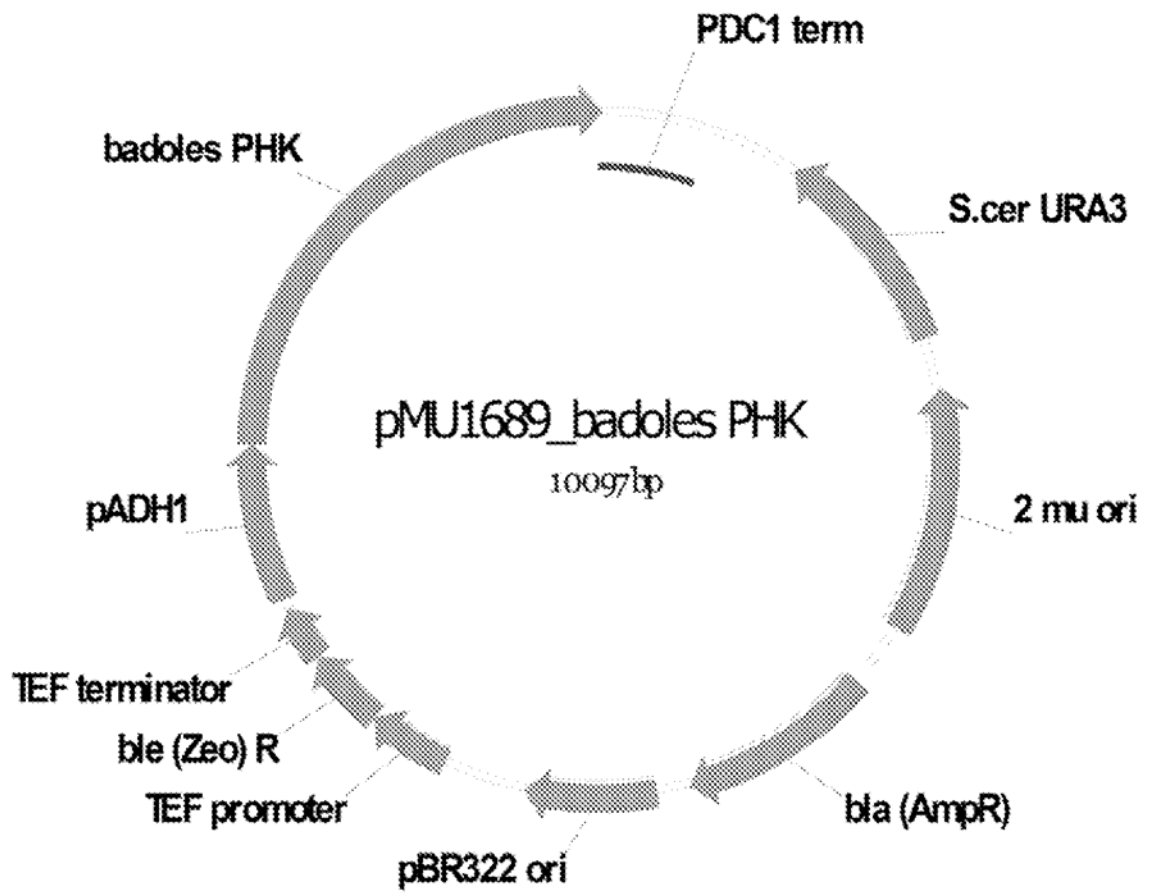


FIG. 23

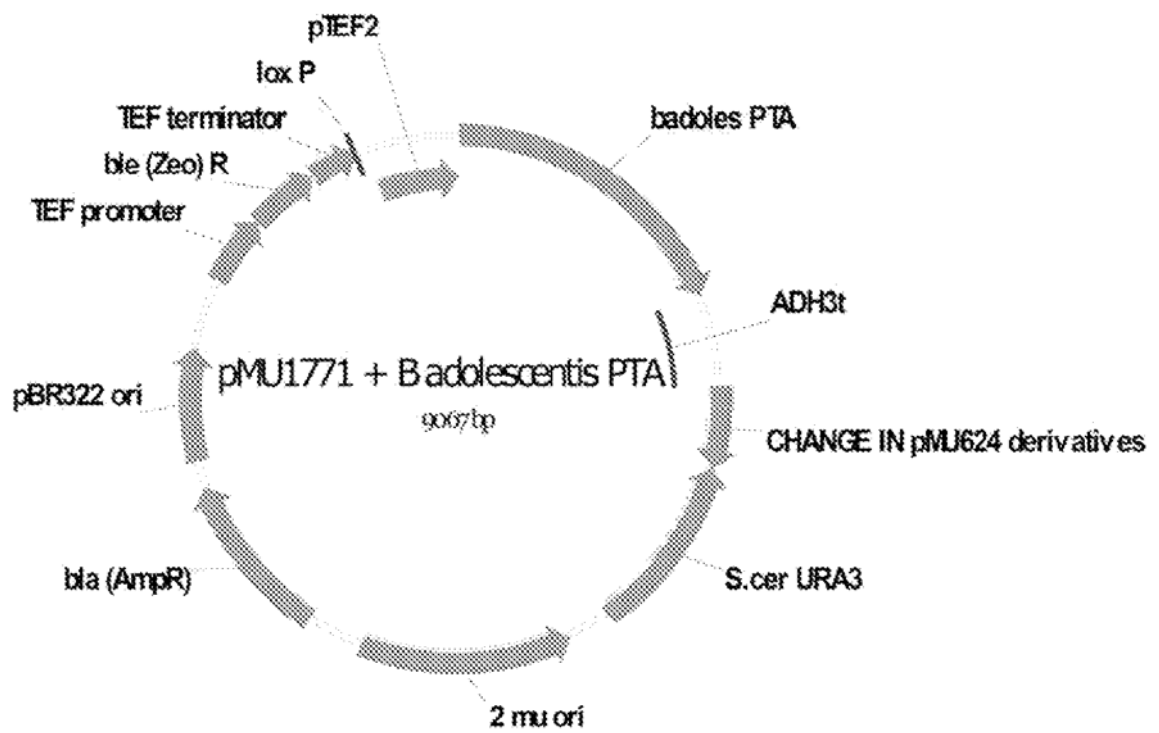


FIG. 24

Rede de redução de glicerol 121, 225 g/ L de Mini Recipientes Maltodextrina,
 Held at 32 °C ao longo, 100 % de GA, 1000 ppm de leia, 0,68 AGU/ gTS GA,
 0,1 g/ L de Inólúco de DCW, 68 horas

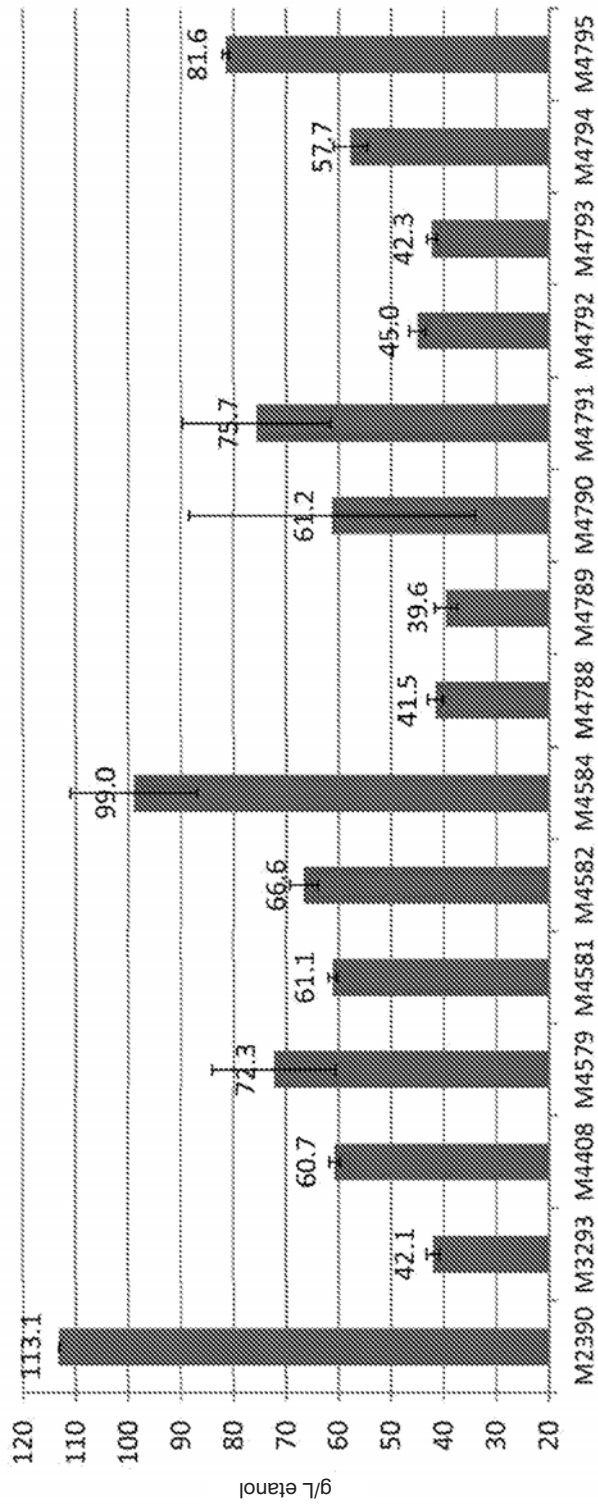


FIG. 25

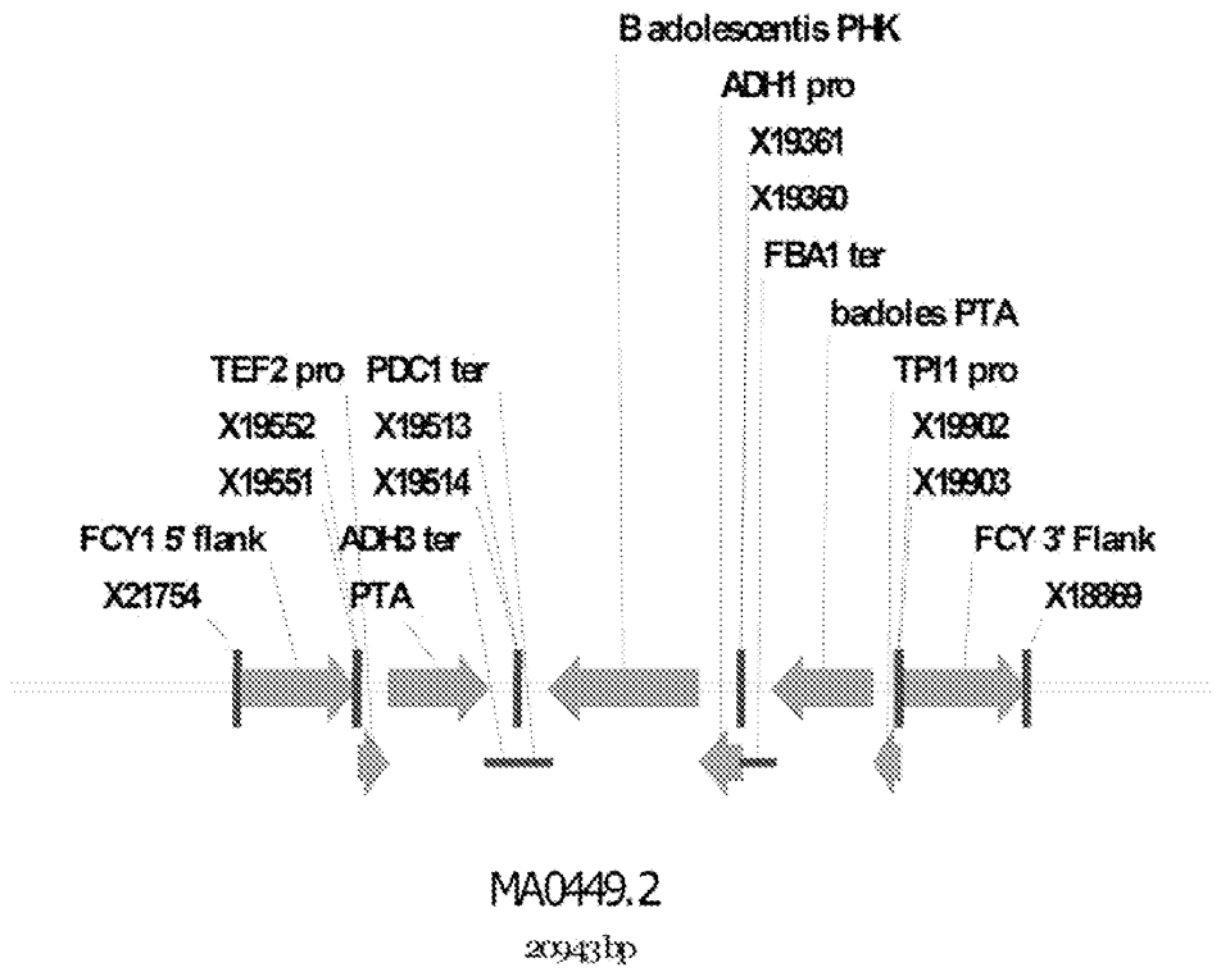


FIG. 27

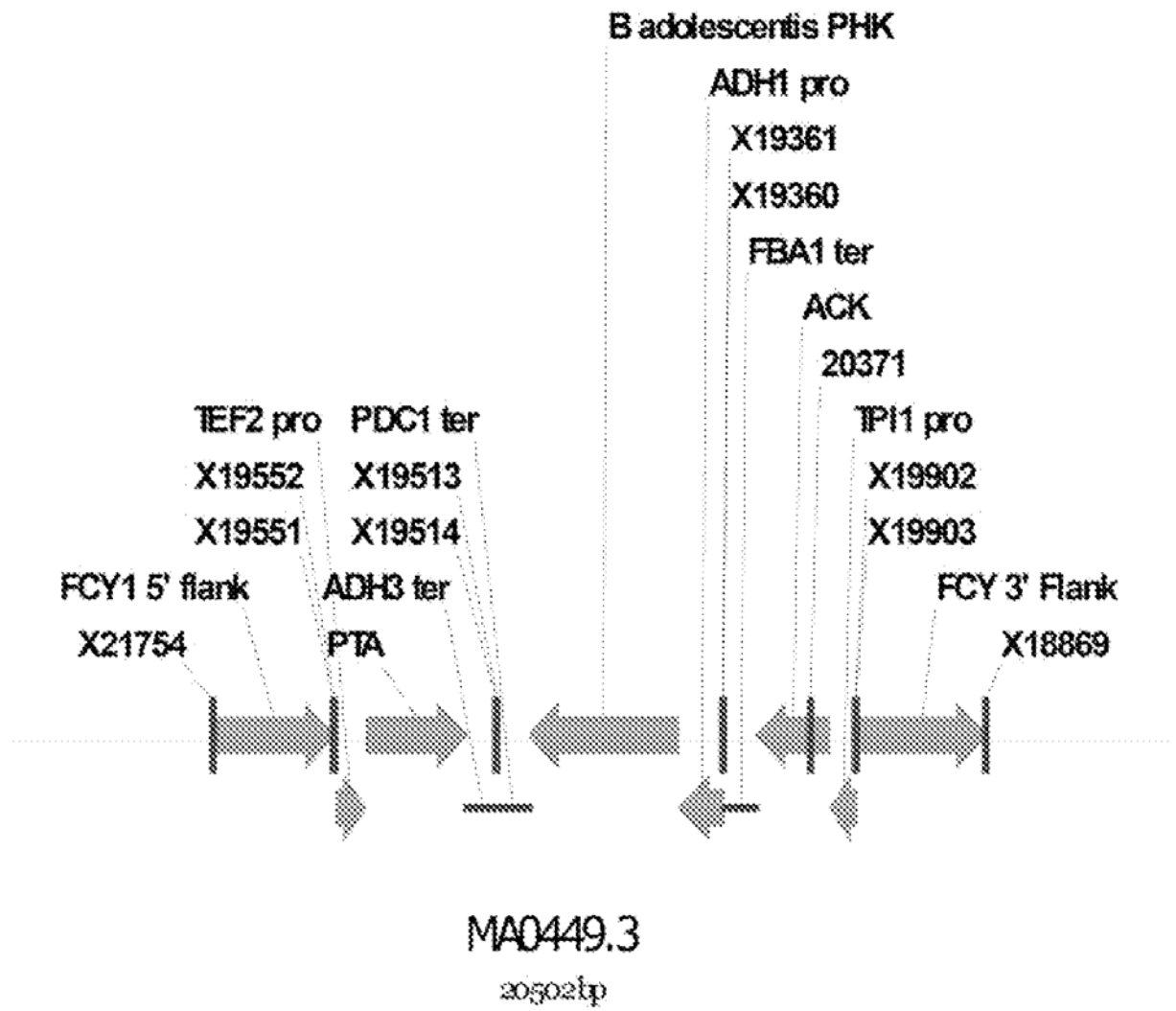
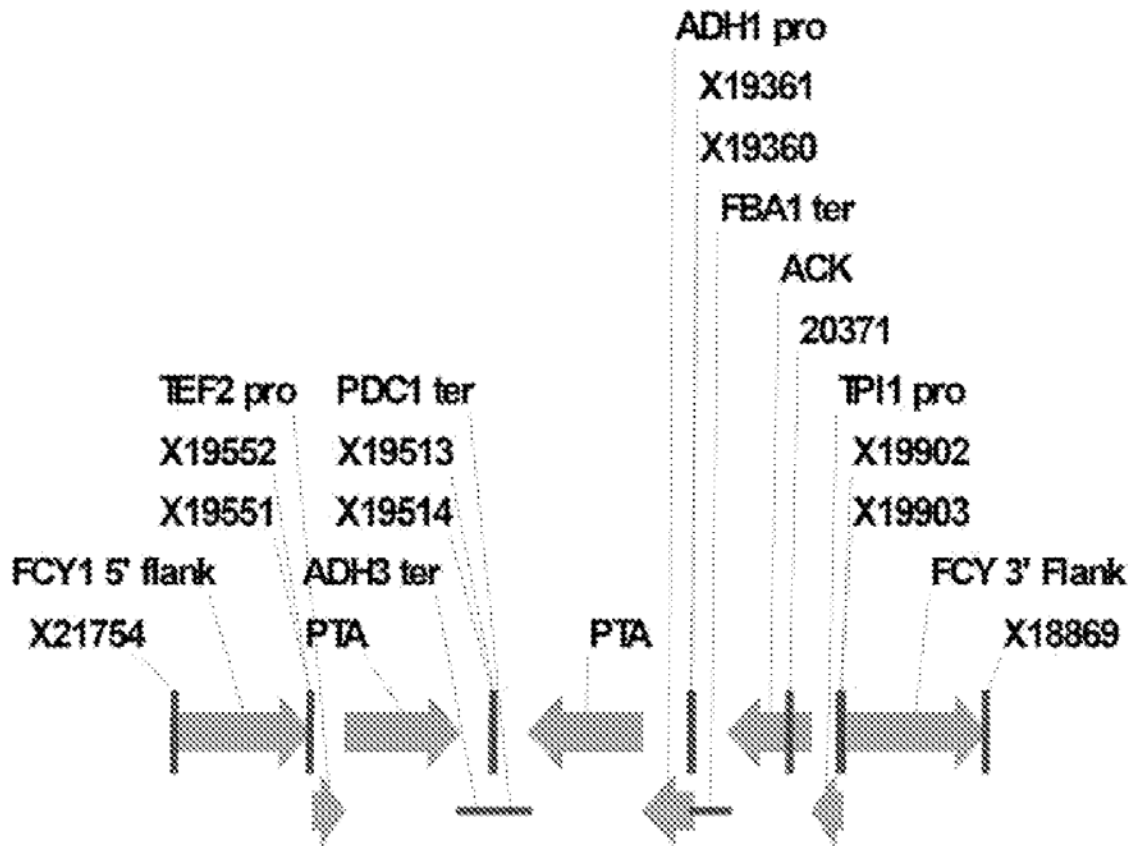


FIG. 28



MA0449.1

19695bp

FIG. 29

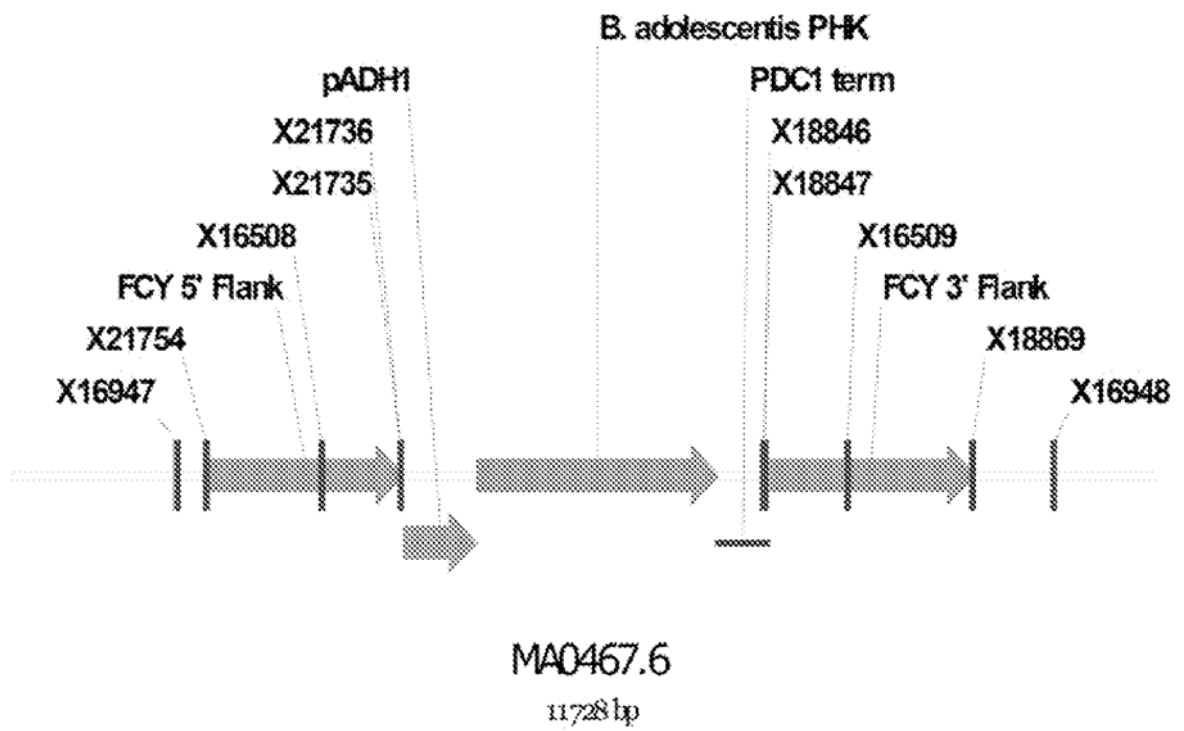


FIG. 30

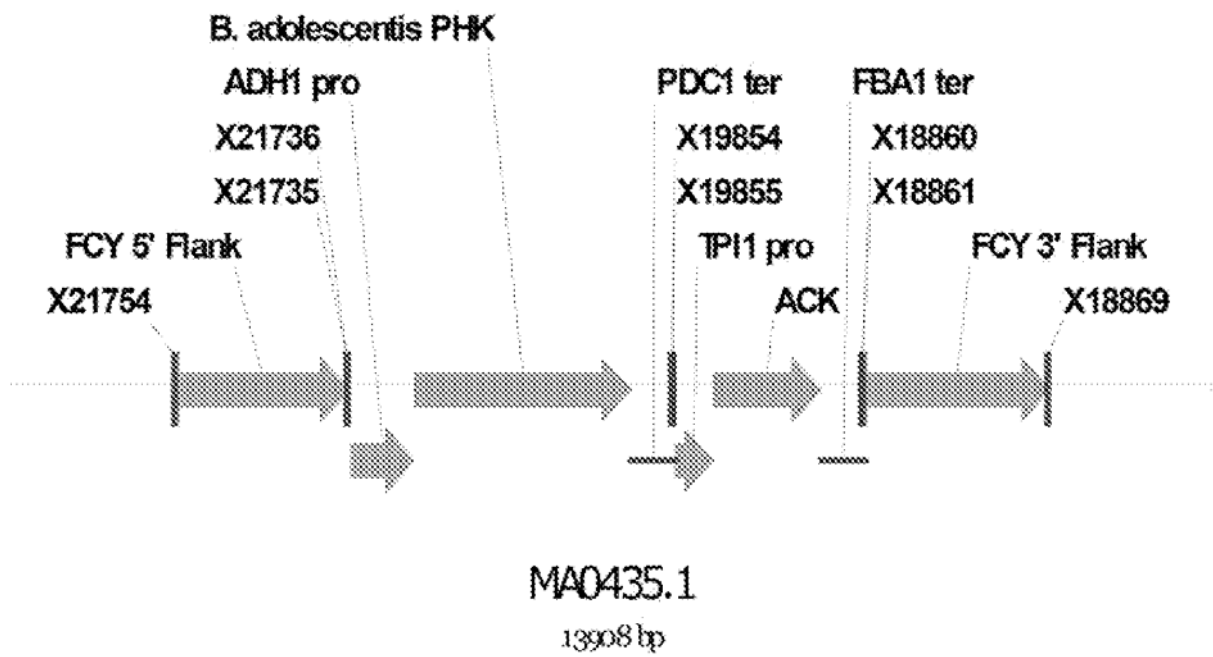


FIG. 31

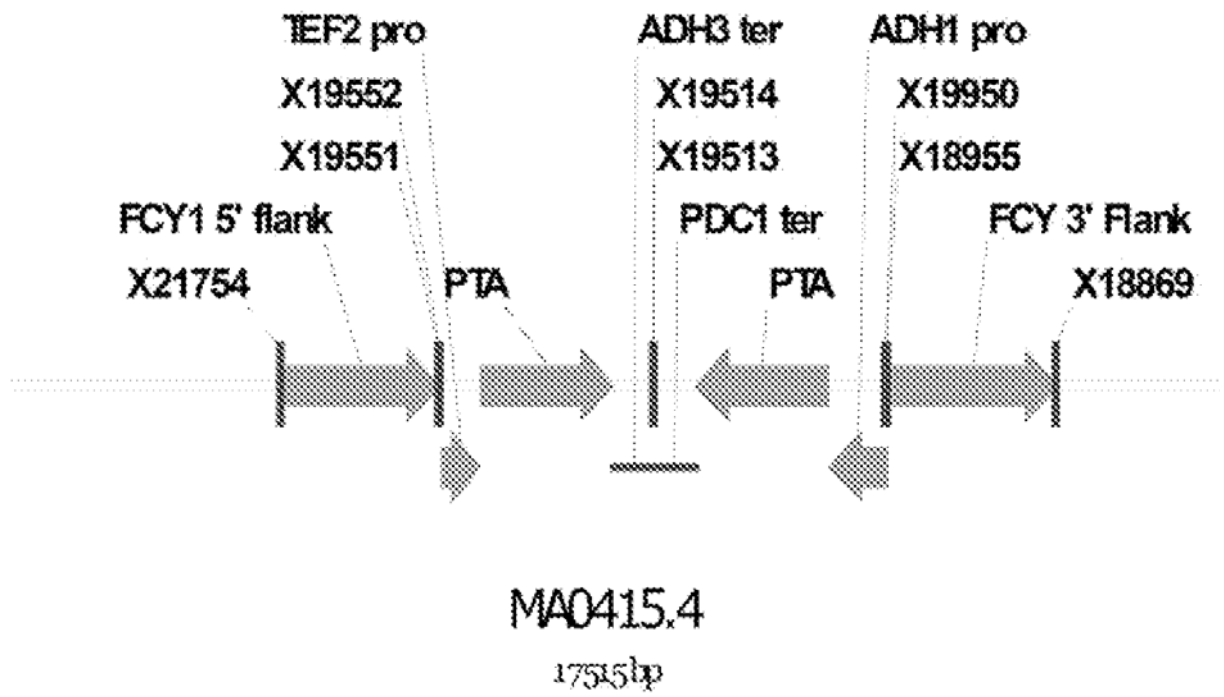


FIG. 32

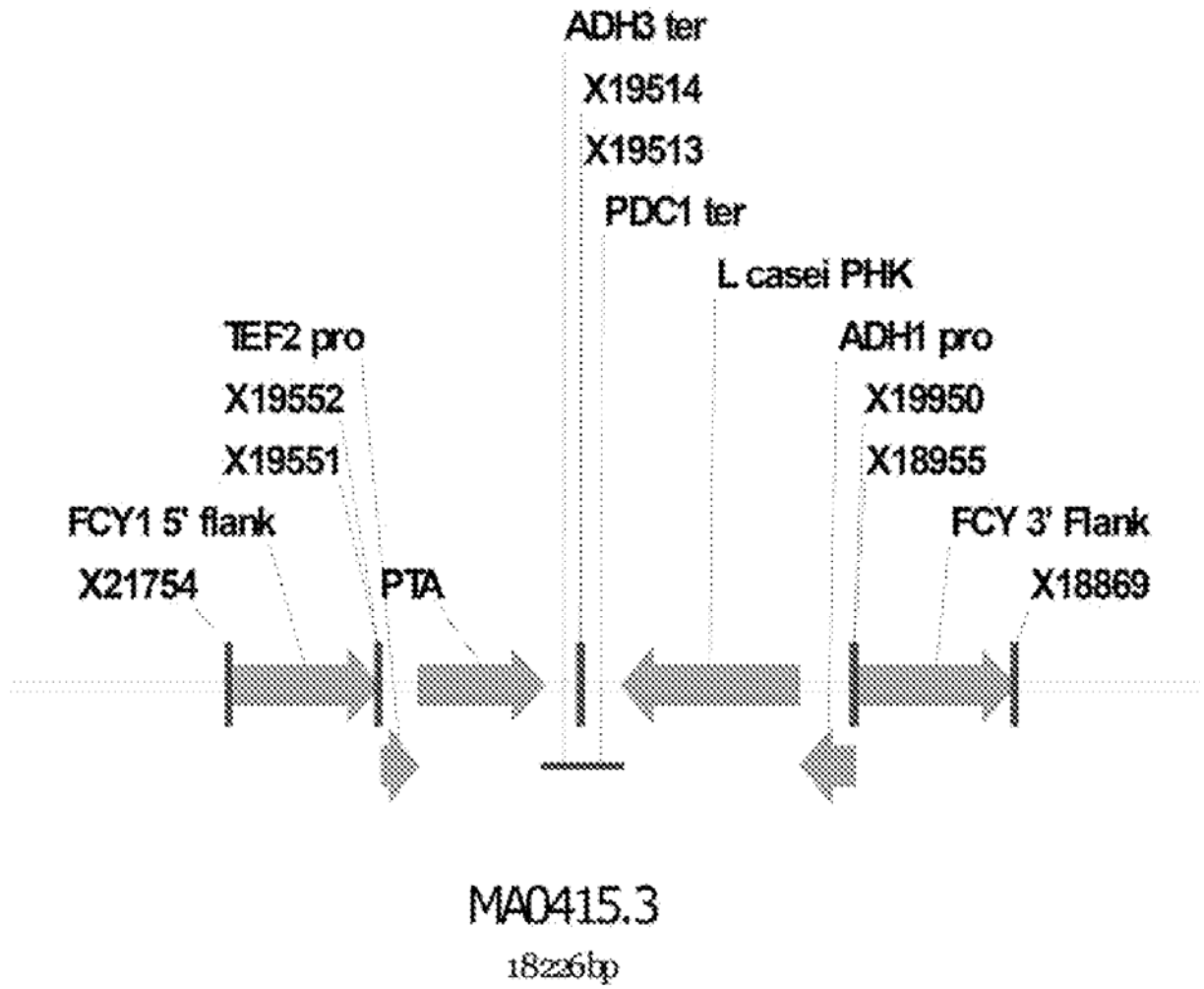
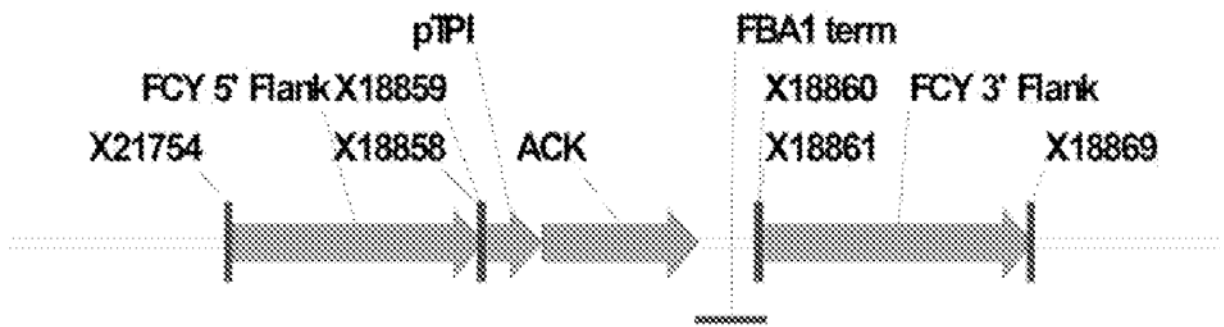


FIG. 33



MA0434.6

10179bp

FIG. 34