



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

(21) PI 0720566-0 A2



* B R P I 0 7 2 0 5 6 6 A 2 *

(22) Data de Depósito: 21/12/2007

(43) Data da Publicação: 04/02/2014

(RPI 2248)

(51) Int.Cl.:

C12P 7/16

(54) Título: PRODUÇÃO DE BUTANOL ATRAVÉS DE LEVEDURA METABOLICAMENTE PROJETADA **(57) Resumo:**

(30) Prioridade Unionista: 21/12/2006 US 60/871.427,
02/02/2007 US 60/888.016, 08/05/2007 US 60/928.283, 21/12/2006
US 60/871.427

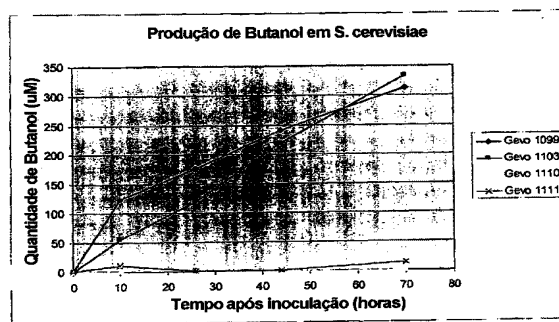
(73) Titular(es): GEVO, INC.

(72) Inventor(es): Jun Urano, Matthew W. Peters, Peter
Meinhold, Reid M. Renny Feldman, Uvini Gunawardena

(74) Procurador(es): Alexandre Ferreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2007088705 de
21/12/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/080124de
03/07/2008



“PRODUÇÃO DE BUTANOL ATRAVÉS DE LEVEDURA METABOLICAMENTE PROJETADA”

Campo da Técnica

Este Pedido reivindica o benefício de (1) Pedido de Patente Provisório dos Estados Unidos Número de Série 60/871,427, depositado em 21 de dezembro de 2006, por Jun Urano, et al., para BUTANOL PRODUCTION BY METABOLICALLY ENGINEERED YEAST; (2) Pedido de Patente Provisório dos Estados Unidos Número de Série 60/888,016, depositado em 2 de Fevereiro de 2007, por Jun Urano, et al., para N-BUTANOL PRODUCTION BY METABOLICALLY ENGINEERED YEAST; e (3) Pedido de Patente Provisório dos Estados Unidos Número de Série 60/928,283, depositado em 8 de maio de 2007, por Uvini P. Guna-wardena, et al., para BUTANOL PRODUCTION BY METABOLICALLY ENGINEERED YEAST. Cada um dos Pedidos acima-identificados está pelo presente incorporado aqui por referência.

Campo da Invenção

A presente invenção refere-se às células de levedura metabolicamente projetadas para a produção de n-butanol em alto rendimento como um combustível alternativo e renovável de transporte, e para outras aplicações. As leveduras da invenção são projetadas para compreender um caminho metabólico que converte uma fonte de carbono tal como glicose e/ou outros carboidratos metabolizáveis, bem como biomassa e os similares, a n-butanol.

Fundamento

Atualmente, aproximadamente 140 bilhões de galões de gasolina são consumidos nos Estados Unidos e aproximadamente 340 bilhões de galões são consumidos mundialmente por ano. Estas quantidades de consumo são apenas crescentes. O Ato Institucional de Política Energética (Energy Policy Act) de 2005 que 7,5 bilhões de galões de combustíveis renováveis sejam utilizados em gasolina até 2012. Em seu Estado do Endereço de União de 2007, o Presidente chamado para aumentar o tamanho e expandir o escopo do padrão de combustível renovável (RFS) exige 35 bilhões de galões de combustíveis renováveis e alternativos em 2017. O Departamento de Energia tem estabelecido uma meta de repor 30 por cento do consumo atual de gasolina dos Estados Unidos com biocombustíveis para 2030 (a iniciativa “30X30”). Em março de 2007, o Brasil e os Estados Unidos assinaram “o Acordo Etanol”, para promover o desenvolvimento de biocombustíveis nas Américas, unindo os maiores produtores de biocombustíveis no mundo – atualmente somando para 70 por cento da produção de etanol do mundo.

Os biocombustíveis possuem o potencial de não somente reduzir a dependência dos Estados Unidos em importar óleo estrangeiro, o qual é vital para segurança da pátria, porém para também diminuir dramaticamente as emissões do gás estufa associado ao aquecimento global. Os biocombustíveis podem ser obtidos a partir da conversão de carbono

baseado em mantimento. Mantimentos agrícolas são considerados renováveis porque, apesar de eles liberarem dióxido de carbono quando queimados, eles capturam aproximadamente uma quantidade equivalente de dióxido de carbono através de fotossíntese.

Nos Estados Unidos, etanol está sendo mais e mais utilizado como um suplemento de oxigenato para gasolina padrão, como uma substituição para metil t-butil éter (MTBE), o produto químico que é difícil de recuperar da água subterrânea e contaminação do solo. Em uma mistura de 10%, o etanol reduz a probabilidade de batida de motor, levantando a avaliação do octano. O uso de 10% de etanol da gasolina é mandado em algumas cidades onde a possibilidade de níveis danificados de emissões de auto é possível, especialmente durante os meses de inverno. Veículos Norte-Americanos de aproximadamente 1980 carros para frente correm em 10% etanol / 90% gasolina (isto é, E10) sem modificações.

Para que o etanol seja utilizado em concentrações mais altas, portanto, um veículo deve ter seu sistema de motor e combustível especialmente projetado ou modificado. Veículos de combustíveis flexíveis (FFVs) são desenhados para sem moverem à gasolina ou uma mistura de acima de 85% de etanol (E85). Portanto, uma vez que um galão de etanol contém menos energia que um galão de gasolina, FFVs tipicamente circula cerca de 20 a 30% menos milhas por galão quando abastecido com E85. Os pacotes de conversão estão disponíveis para converter um veículo convencional a um FFV que inclui tipicamente um dispositivo eletrônico para aumentar o volume de combustível injetado por ciclo (devido ao conteúdo mais baixo de energia de etanol) e, em alguns casos, um tratamento químico protege o motor de corrosão. Mais de 4 milhões de veículos de combustível flexível são atualmente operados nas estradas nos Estados Unidos, embora um estudante 2002 descobrisse que menos de 1% do combustível consumido por estes veículos serem E*%.

O butanol possui diversas vantagens sobre o etanol para combustível. Enquanto este pode ser feito dos mesmos mantimentos como etanol, ao contrário de etanol, é compatível com gasolina e petrodiesel em qualquer razão. O butanol pode também ser utilizado como um combustível puro na existência de carros sem modificações e tem sido proposto como um combustível a jato pelo Grupo do Sr. Richard Branson em linhas aéreas virgens. Ao contrário de etanol, o butanol não absorve água e pode então ser armazenado e distribuído na infra-estrutura petroquímica existente. Devido ao seu maior conteúdo de energia, a economia do combustível (milhas por galão) é melhor que aquela do etanol. Também, misturas butanol-gasolina têm pressão de vapor menor que misturas etanol-gasolina, que é importante na redução de emissões de hidrocarbonetos evaporativos. Estas propriedades fornecem o potencial para o butanol ser utilizado definitivamente da mesma maneira como gasolina, sem modificação do veículo e sem o peso em consumidores reabastecer mais frequentemente.

O n-butanol pode ser produzido utilizando espécie de *Clostridium* que produzem na-

turalmente através de um percurso que leva de butiril-CoA a n-butanol. Uma desvantagem da espécie *Clostridium* é que a produção ocorre em um processo de duas etapas que envolvem uma fase de crescimento produzindo ácido seguido por uma fase de produção de solvente. Também, grandes quantidades de bioprodutos, tais como hidrogênio, etanol, e acetona são produzidos neste processo, assim limitando o rendimento estequiométrico de n-butanol para aproximadamente 0,6 mol de n-butanol por mol de glicose consumida. Adicionalmente, a espécie *Clostridium* perde sua habilidade para produzir solventes sob condições de culturas contínuas (Cornilot et al., J. Bacteriol. 179: 5442-5447, 1997). O percurso de *Clostridium* mostrando a conversão de glicose a ácidos e solventes em *C. acetobutylicum*, incluindo o caminho para produzir n-butanol de acetil-CoA, é mostrado na Figura 1.

Sumário da invenção

Em uma modalidade, há fornecido uma levedura metabolicamente projetada capaz de metabolizar uma fonte de carbono para produzir n-butanol, pelo menos um percurso configurado para produzir uma quantidade aumentada de acetil-CoA citosólico relativo à outra quantidade de acetil-CoA citosólico produzido por uma levedura tipo selvagem, e pelo menos um gene anormal para codificar e expressar pelo menos uma enzima para um percurso metabólico capaz de utilizar NADH para converter acetil-CoA ao n-butanol.

Em outra modalidade, há fornecido um método para produzir n-butanol, o método compreendendo (a) fornecer levedura metabolicamente projetada capaz de metabolizar uma fonte de carbono para produzir n-butanol, pelo menos um percurso configurado para produzir uma quantidade aumentada de acetil-CoA citosólico relativo à outra quantidade de acetil-CoA citosólico produzido por uma levedura tipo selvagem, e pelo menos um gene anormal para codificar e expressar pelo menos uma enzima para um percurso metabólico capaz de utilizar NADH para converter acetil-CoA ao n-butanol; e (b) cultivar a levedura metabolicamente projetada por um período de tempo e sob condições para produzir o n-butanol.

Em ainda outra modalidade, há fornecido um método para produzir n-butanol, utilizando levedura, o método compreendendo (a) projetar metabolicamente a levedura para aumentar a produção de acetil-CoA citosólica; (b) projetar metabolicamente a levedura para expressar um percurso metabólico que converte uma fonte de carbono a n-butanol, em que o percurso exige pelo menos uma enzima não-nativa da levedura, em que as etapas (a) e (b) podem ser desempenhadas na ordem; e (c) cultivar a levedura por um período de tempo de sob condições para produzir uma quantidade recuperável de n-butanol.

Em ainda outra modalidade, há fornecido um método para produzir n-butanol, utilizando levedura, o método compreendendo (a) cultivar uma levedura metabolicamente projetada por um período de tempo e sob condições para produzir uma biomassa da célula de levedura sem ativar a produção de n-butanol; e (b) alterar as condições de cultura para outro período de tempo e sob condições para produzir uma quantidade recuperável de n-butanol.

Em outra modalidade, há fornecido uma levedura metabolicamente projetada capaz de metabolizar uma fonte de carbono e produzir uma quantidade aumentada de acetil-CoA relativo à quantidade de acetil-CoA citosólico produzido por uma levedura tipo selvagem.

Em ainda outra modalidade, há fornecido um método para aumentar a atividade metabólica da levedura, o método compreendendo produzir uma quantidade aumentada de acetil-CoA citosólico da levedura relativo à quantidade de acetil-CoA citosólico produzido por uma levedura tipo selvagem.

Em ainda outra modalidade, há fornecido uma levedura metabolicamente projetada possuindo pelo menos um percurso configurado para produzir uma quantidade aumentada de acetil-CoA citosólico relativo à outra quantidade de acetil-CoA citosólico produzido por uma levedura tipo selvagem.

Outras modalidades são também descritas.

Breve Descrição das Figuras

Modalidades ilustrativas da invenção são ilustradas nas figuras, nas quais:

A Figura 1 ilustra os percursos metabólicos envolvidos na conversão de glicose, pentose, e granulose a ácidos e solventes em *Clostridium acetobutylicum*. Hexoses (por exemplo, glicose) e pentoses são convertidas a piruvato, ATP e NADH. Subsequentemente, piruvato é descarboxilado oxidativamente a acetil-CoA por um piruvato-ferredoxina oxidoreductase. A redução equivalente gerada nesta etapa é convertida a hidrogênio por uma hidrogenase somente de ferro. Acetil-CoA é o ponto filial intermediário, conduzindo à produção de ácidos orgânicos (acetato e butirato) e solventes (acetona, butanol e etanol).

A Figura 2 ilustra um percurso químico para produzir butanol em leveduras.

A Figura 3 ilustra percursos utilizados por *Sacchromyces cerevisiae* para gerar acetil-CoA.

As Figuras 4 e 5 ilustram vários plasmídeos exemplares que podem ser utilizados para expressar várias enzimas de acordo com a presente descrição.

A Figura 4 ilustra um plasmídeo exemplar que pode ser utilizado para expressar várias enzimas de acordo com a presente descrição como descrito na Tabela 1.

A Figura 5 ilustra um plasmídeo exemplar que pode ser utilizado para expressar várias enzimas de acordo com a presente descrição como descrito na Tabela 2.

A Figura 6 ilustra geograficamente a produção de n-butanol em tempo excessivo por Gevo 1099 e Gevo 1103 como comparada ao Vetor que somente isola o controle, Gevo 1110 e Gevo 1111, como segue:

- () Gevo 1099;
- () Gevo 1103;
- () Gevo 1110;
- () Gevo 1111.

A Figura 7 ilustra o plasmídeo pGV1090 contendo genes *bcd*, *etfb*, *etfa* de *C. ace-*

tobutyllicum inseridos nos sítios *EcoRI* e *BamHI* e a jusante de um promotor de lambda de fago modificado LacO-1 (P_{L-lac}). O plasmídeo também realiza uma replicação do gene de origem de pBR322 e um gene resistente a cloramfenicol.

5 A Figura 8 ilustra o plasmídeo pGV1095 para expressão de butiraldeído desidrogenase (*bdhB*) de *C. acetobutyllicum* inseridos nos sítios *EcoRI* e *BamHI* e fluxo a jusante de um promotor de lambda de fago modificado LacO-1 (P_{L-lac}). O plasmídeo também realiza uma replicação do gene de origem de ColE1 e um gene resistente a cloramfenicol.

A Figura 9 ilustra o plasmídeo para expressão de crotonase (CRT) de *C. acetobutyllicum* inserido nos sítios *EcoRI* e *BamHI* e fluxo a jusante de um promotor de lambda de fago modificado LacO-1 (P_{L-lac}). O plasmídeo também realiza uma replicação do gene de origem de pBR322 e um gene resistente a cloramfenicol.

15 A Figura 10 ilustra o plasmídeo pGV1037 para expressão de hidroxibutiril-CoA desidrogenase (*hbd*) de *C. acetobutyllicum* inseridos nos sítios *EcoRI* e *BamHI* e fluxo a jusante de um promotor de lambda de fago modificado LacO-1 (P_{L-lac}). O plasmídeo também realiza uma replicação do gene de origem de ColE1 e um gene resistente a cloramfenicol.

A Figura 11 ilustra o plasmídeo pGV1031 para expressão de tiolase (*tal*) de *C. acetobutyllicum* inseridos nos sítios *EcoRI* e *BamHI* e fluxo a jusante de um gene Laços. O plasmídeo também realiza uma replicação do gene de origem de pBR322 e um gene resistente a cloramfenicol.

20 A Figura 12 ilustra o plasmídeo pGV1049 para expressão de crotonase (CRT) de *Clostridium beijerinckii* inserido nos sítios *EcoRI* e *BamHI* e fluxo a jusante de um promotor de lambda de fago modificado LacO-1 (P_{L-lac}). O plasmídeo também realiza uma replicação do gene de origem e um gene resistente a cloramfenicol.

25 A Figura 13 ilustra o plasmídeo pGV1050 para a expressão de hidroxibutiril-CoA desidrogenase (*hbd*) de *C. beijerinckii* inserido nos sítios *EcoRI* e *BamHI* e fluxo a jusante de um promotor de lambda de fago modificado LacO-1 (P_{L-lac}). O plasmídeo também realiza uma replicação do gene de origem e um gene resistente a cloramfenicol.

30 A Figura 14 ilustra o plasmídeo pGV1091 para a expressão de álcool desidrogenase (*adhA*) de *C. beijerinckii* inserido nos sítios *HindIII* e *BamHI* e fluxo a jusante de um promotor de lambda de fago modificado LacO-1 (P_{L-lac}). O plasmídeo também realiza uma replicação do gene de origem e um gene resistente a cloramfenicol.

35 A Figura 15 ilustra o plasmídeo pGV1096 para a expressão de álcool desidrogenase (*aldh*) de *C. beijerinckii* inserido nos sítios *EcoRI* e *BamHI* e fluxo a jusante de um promotor de lambda de fago modificado LacO-1 (P_{L-lac}). O plasmídeo também realiza uma replicação do gene de origem e um gene resistente a cloramfenicol.

Descrição Detalhada

Os microorganismos de levedura recombinantes são descritos que são projetados

para converter uma fonte de carbono em n-butanol com alto rendimento. Em particular, os microorganismos de levedura recombinantes são descritos que são capazes de metabolizar uma fonte de carbono para produção de n-butanol em um rendimento de pelo menos 5% de teórico, e, em alguns casos, um rendimento de mais de 50% de teórico. Como utilizado aqui, o termo “rendimento” refere-se ao rendimento molar. Por exemplo, o rendimento iguala 100% quando um mol de glicose é convertido a um mol de n-butanol. Em particular, o termo “rendimento” é definido como o mol do produto obtido por mol de nanômero da fonte de carbono e pode ser expresso como por cento. A menos que caso contrário notado, o rendimento é expresso como uma porcentagem do rendimento teórico. O “Rendimento Teórico” é definido como os mols máximos do produto que podem ser gerados por um mol dado do substrato como ditado através de estequiometria do percurso metabólico utilizado para fazer o produto. Por exemplo, o rendimento teórico para uma conversão típica de glicose a n-butanol é 100%. Como tal, um rendimento de n-butanol proveniente da glicose de 95% seria ser expresso como 95% de teórico ou 95% de rendimento teórico.

Os microorganismos aqui descritos são projetados, utilizando técnicas de engenharia genética, para prover microorganismos que utilizam enzimas anormais expressadas para produzir n-butanol em alto rendimento. O rendimento de butanol é dependente da conversão de alto rendimento de uma fonte de carbono a acetil-CoA, e a conversão de alto rendimento subsequente de acetil-CoA a butanol. A invenção refere-se à combinação destes dois aspectos resultando em um microorganismo que produz n-butanol em um alto rendimento.

Como utilizado aqui, o termo “microorganismo” inclui espécies microbiais procarióticas e eucarióticas da *Bacteria Domains* e *Eukaryote*, o último incluindo levedura e filamentosos fungi, protozoa, algae, ou Protista maior. Os termos “célula”, “células microbiais”, e “micróbios” são utilizados permutavelmente com o termo microorganismo. Em uma modalidade preferida, o microorganismo é uma levedura, por exemplo, *Saccharomyces cerevisiae* ou *Kluyveromyce lactis* ou *E. coli*.

“Levedura”, refere-se a um domínio de organismos eucarióticos, colocados filogeneticamente no reino fungi, sob o filo Ascomycota e Basidiomycota. Aproximadamente 1500 espécies de leveduras estão descritas até o momento. Leveduras são primariamente microorganismos unicelulares que reproduzem primariamente através de germinação assexuada mesmo se algumas leveduras multicelulares e aquelas que reproduzem através de ramificação binária forem descritas. A maioria das espécies é classificada como leveduras aeróbias, porém facultativas e anaeróbias são também bem-conhecidas. Com relação à fisiologia fermentativa da levedura, as leveduras são categorizadas em dois grupos – Crabtree – positivo e Crabtree – negativo.

Resumidamente, o efeito de Crabtree é definido como a inibição do consumo de oxigênio por um microorganismo quando cultivado sob condições aeróbicas devido à presen-

ça de uma alta concentração de glicose (por exemplo, 50 gramas de glicose/L). desse modo, uma célula de levedura possuindo um fenótipo de Crabtree-positivo continua a fermentar sem dizer respeito à disponibilidade de oxigênio devido à presença de glicose, enquanto uma célula de levedura possuindo um fenótipo de Crabtree negativo não exibe inibição mediada de glicose de consumo de oxigênio. Exemplos, de células de levedura tipicamente possuindo um fenótipo de Crabtree-positivo inclui, sem limitação, células de levedura de gênero *Saccharomyces*, *ZygoSaccharomyces*, *Torulaspora* e *Dekkera*., Exemplos, de células de levedura tipicamente possuindo um fenótipo de Crabtree-negativo inclui, sem limitação, células de levedura de gênero *Kluyveromyces*, *Pichis*, *Hansenula* e *Candida*.

Certos aspectos detalhados e modalidades da invenção estão ilustrados abaixo, seguindo uma definição de certos termos utilizados na aplicação. O termo “fonte de carbono” geralmente refere-se a um substrato ou composto adequado para ser utilizado como uma fonte de carbono para crescimento da célula de levedura. As fontes de carbono podem estar em várias formas, incluindo, mas não limitados a polímeros tais como xilan e pectina, carboidratos, ácidos, alcoóis, aldeídos, cetonas, aminoácidos, peptídeos, etc. Tais fontes de carbono mais especificamente incluem, por exemplo, vários monossacarídeos tal como glicose e frutose, oligossacarídeos tais como lactose ou sucrose, polissacarídeos, material celulósico, ácidos graxos saturados ou insaturados, succinato, lactose, acetato, etanol, ou misturas dos mesmos e misturas não-purificadas de mantimentos renováveis, tais como soro do queijo permeável, licor de “comsteep”, melado do açúcar da beterraba, e malte da cevada.

Fontes de carbono que servem como materiais de partida adequáveis para a produção de produtos de n-butanol incluem, mas não estão limitadas a, biomassa hidrolisada, glicose, amido, celulose, hemicelulose, xilose, lignina, dextrose, frutose, galactose, milho, farinha de milho liquefeita, licor íngreme do milho (um subproduto do processo de trituração molhada do milho que contém nutrientes lixiviados fora do milho durante imersão), melado, lignocelulose, e maltose. Organismos fotossintéticos podem adicionalmente produzir uma fonte de carbono como um produto de fotossíntese. Em uma modalidade preferida, fontes de carbono podem ser selecionadas de biomassa hidrolisada e glicose. A glicose, dextrose, e amido podem ser provenientes de uma fonte endógena ou exógena.

Deve ser notado que outras fontes de carbono mais acessíveis e/ou de menor custo podem ser substituídas por glicose com modificações relativamente menores para microorganismos hospedeiros. Por exemplo, em certas modalidades, o uso de outros substratos renováveis e economicamente praticáveis pode ser preferido. Este inclui: desperdício agrícola, materiais de empacotamento baseado em amido, fibras de milho hidrolisadas, melado de soja, fruta processando desperdício industrial, e soro do leite permeado, etc.

Açúcares de cinco carbonos são somente utilizados como fontes de carbono com

espécies de microorganismos que sejam capazes de processar estes açúcares, por exemplo, *E. coli* B. Em algumas modalidades, glicerol, um carboidrato de três carbonos, pode ser utilizado como uma fonte de carbono para as biotransformações. Em outras modalidades, glicerina, ou glicerol impuro obtidos pela hidrólise de triglicerídeos a partir da gordura e óleos de plantas e animais, podem ser utilizados como uma fonte de carbono, enquanto que quaisquer impurezas não afetam contrariamente microorganismos hospedeiros.

O termo “enzima”, como utilizado, aqui se refere a qualquer substância que catalisa ou promove uma ou mais reações químicas ou bioquímicas, que usualmente inclui enzimas totalmente ou parcialmente compostas de um polipeptídio, mas pode incluir enzimas compostas de diferentes moléculas incluindo polinucleotídeos.

O termo “polinucleotídeo” é utilizado aqui permutavelmente com o termo “ácido nucléico” e se refere a um polímero orgânico composto de dois ou mais monômeros incluindo nucleotídeos, nucleosídeos ou análogos do mesmo, incluindo, mas não limitado a, ácido desoxirribonucleico (DNA) nativo ou desnaturado, sense ou anti-sense de qualquer comprimento e, onde apropriado, ácido ribonucleico (RNA) nativo ou desnaturado, sense ou anti-sense de qualquer comprimento, incluindo siRNA. O termo “nucleotídeos” se refere a qualquer de diversos compostos que consistem de um açúcar da ribose ou desoxirribose unido a uma base purina ou uma pirimidina e a um grupo fosfato, e que são as unidades estruturais básicas de ácidos nucléicos. O termo “nucleosídeo” se refere a um composto (como guanosina ou adenosina) que consiste em uma base purina ou pirimidina combinada com ribose ou desoxirribose é encontrada especialmente em ácidos nucléicos. O termo “nucleotídeo análogo” ou “nucleosídeo análogo” se refere, respectivamente, a um nucleotídeo ou nucleosídeo no qual um ou mais átomos individuais têm sido recolocados com um átomo diferente ou com um grupo funcional diferente. Do mesmo modo, o termo polinucleotídeo inclui ácidos nucléicos de qualquer comprimento, DNA, RNA, análogos e fragmentos do mesmo. Um polinucleotídeo de três ou mais nucleotídeos é também chamado oligômero nucleotídico ou oligonucleotídeo.

O termo “proteína” ou “polipeptídio” como utilizado aqui indica um polímero composto de dois ou mais monômeros amino acídicos e/ou análogos dos mesmos. Como utilizado aqui, o termo “aminoácido” ou “monômeros amino acídicos” se referem a quaisquer aminoácidos natural e/ou sintético incluindo glicina e ambos os isômeros D ou L. o termo “aminoácido análogo” se refere a um aminoácido no qual um ou mais átomos individuais têm sido recolocados, seja com um átomo diferente, ou com um grupo funcional diferente. Do mesmo modo, o termo polipeptídio inclui polímeros amino acídicos de qualquer comprimento incluindo proteínas de comprimento total, e peptídeos bem como análogos e fragmentos do mesmo. Um polipeptídio de três ou mais aminoácidos é também chamado um oligômero de proteína ou oligopeptídio.

O termo “anormal” ou “exógeno” como utilizado aqui com referência às moléculas e em particular enzimas e polinucleotídeos, indica moléculas que são expressas em um organismo, outras que o organismo do qual eles originaram ou encontraram na natureza, independentemente do nível de expressão que pode ser menor, igual ou maior que o nível de expressão da molécula no microorganismo nativo.

Por outro lado, o termo “nativo” ou “endógeno” como utilizado aqui com referência às moléculas, e em particular enzimas e polinucleotídeos, indica moléculas que são expressas no organismo no qual eles originaram ou são encontrados na natureza, independentemente do nível de expressão que pode ser menor, igual ou maior que o nível de expressão da molécula no microorganismo nativo.

Em certas modalidades, o microorganismo não projetado, nativo, é incapaz de converter uma fonte de carbono a n-butanol, ou um ou mais do(s) intermediário(s) metabólicos dos mesmos, devido a, por exemplo, tal hospedeiro tipo selvagem carece de uma ou mais enzimas requeridas em um percurso de produção de n-butanol.

Em certas modalidades, o microorganismo não projetado, nativo, é capaz de somente converter quantidades pequenas de uma fonte de carbono a n-butanol, a um rendimento de menos de 0,1% de teórico.

Por exemplo, microorganismos tais como *E. coli* ou *Saccharomyces sp.* Geralmente não possuem um percurso metabólico para converter açúcares tais como glicose em n-butanol, mas é possível transferir um percurso produzindo n-butanol a partir de uma espécie produzindo n-butanol, (por exemplo, *Clostridium*) em um hospedeiro anormal eucariótico, tal como *E. coli* ou *Saccharomyces sp.*, e utilizar o microorganismo recombinante resultante para produzir n-butanol.

Os Microorganismos, em geral, são apropriáveis como hospedeiros se eles possuírem propriedades inerentes tais como resistência ao solvente que permitirá a eles metabolizar uma fonte de carbono em ambientes contendo solvente.

Os termos “hospedeiro”, “células hospedeiras” e “células hospedeiras recombinantes” são utilizados permutavelmente aqui e se referem não somente à célula do indivíduo particular mas também à prole ou prole potencial de tal célula. Devido a certas modificações poderem ocorrer em gerações que sucedem devido à mutação ou influências ambientais, tal como a prole pode não ser de fato, idêntica à célula mãe, mas estão ainda incluídas dentro do escopo do termo como utilizado aqui.

Os Hospedeiros úteis para produção de n-butanol podem ser tanto microorganismo eucariótico ou procariótico. Uma célula de levedura é o hospedeiro preferido tal como, mas não limitado a, *Saccharomyces cerevisiae* ou *Kluyveromyces lactis*. Em certas modalidades, outros microorganismos hospedeiros de levedura apropriados incluem, mas não estão limitados às espécies *Pichia*, *Yarrowia*, *Aspergillus*, *Kluyveromyces*, *Pachysolen*, *Rhodotorula*,

ZygoSaccharomyces, *Galactomyces*, *SchizoSaccharomyces*, *Penicillium*, *Torulaspora*, *Debaryomyces*, *Williopsis*, *Dekkera*, *Kloeckera*, *Metschnikowia* e *Candida*.

Em particular, os microorganismos recombinantes aqui descritos são projetados para ativar, e em particular expressam enzimas anormais que pode ser utilizadas na produção de n-butanol. Em particular, em certas modalidades, os microorganismos recombinantes são projetados para ativar enzimas anormais que catalisam a conversão de acetil-CoA a n-butanol.

Os termos "ativado" ou "de ativação" como utilizados aqui com referência a uma molécula biologicamente ativa, tal como uma enzima, indica qualquer modificação no genoma e/ou proteoma de um microorganismo que aumenta a atividade biológica da molécula biologicamente ativa no microorganismo. Ativações moleculares incluem, mas não estão limitadas a, modificações que resultam na conversão da molécula de uma forma biologicamente inativa a uma forma biologicamente ativa e de uma forma biologicamente ativa para uma forma biologicamente mais ativa, e modificações que resultam na expressão da molécula biologicamente ativa em um microorganismo em que a molécula biologicamente ativa não foi previamente expressada. Por exemplo, a ativação de uma molécula biologicamente ativa pode ser desempenhada expressando uma codificação de polinucleotídeo anormal ou nativo para a molécula biologicamente ativa no microorganismo, expressando uma codificação de polinucleotídeo anormal ou nativo para uma enzima envolvida no percurso para a síntese da molécula ativa biológica no microorganismo, expressando uma molécula anormal ou nativa que aumenta a expressão da molécula biologicamente ativa no microorganismo.

Uma sequência de gene ou DNA é "anormal" a um microorganismo se este não for parte do genoma daquele microorganismo como normalmente existe, isto é, ele não é naturalmente parte do genoma da versão tipo selvagem do microorganismo. Por meio de exemplo, e sem limitação, para *S. cerevisiae*, um DNA codificando qualquer um do seguinte é considerado ser anormal. A proteína ou enzima de *Escherichia coli*, proteínas ou enzimas de quaisquer outros microorganismos outros que não *S. cerevisiae*, sequências de controle translacional e não-translacional, e um mutante ou de outro modo proteína de *S. cerevisiae* ou RNA modificada, se o mutante surgir ou não pela seleção ou for projetado em *S. cerevisiae*. Além disso, construções que possuem uma proteína de *S. cerevisiae* tipo selvagem sob o controle translacional e/ou transcricional de um elemento regulatório anormal (promotor induzível, melhoria, etc.) é também considerado ser DNA anormal.

A metabolização de uma fonte de carbono é dita ser "equilibrado", quando o NADH produzido durante as reações de oxidação da fonte de carbono igual ao NADH utilizado para converter acetil-CoA a metabolização dos produtos finais. Somente sob estas condições todo o NADH é reciclado. Sem reciclagem, o raio NADH / NAD⁺ se torna desequilibrado (ou seja, aumenta), o qual pode levar o organismo a morrer, em última instância, a menos que

uma série de reações químicas metabólicas alternadas esteja disponível para manter um raio $\text{NADH} / \text{NAD}^+$.

Em certas modalidades, o rendimento de n-butanol é mais elevado se o microrganismo não utilizar respiração aeróbia ou anaeróbia uma vez que o carbono for perdido na forma de dióxido de carbono em tais casos.

Em certas modalidades, o microorganismo produz n-butanol fermentativamente sob condições anaeróbicas para que o carbono não seja perdido na forma de dióxido de carbono.

O termo “respiração aeróbica” refere-se a uma via respiratória na qual o oxigênio é o acceptor de elétron final e a energia é tipicamente produzida na forma de uma molécula ATP. O termo “via respiratória aeróbica” é utilizada permutavelmente com a expressão “metabolismo aeróbico”, “metabolismo oxidativo” ou “respiração celular”.

Por outro lado, o termo “respiração anaeróbica” refere-se a uma via respiratória na qual o oxigênio não é o acceptor de elétron final e a energia é tipicamente produzida na forma de uma molécula ATP. Isto inclui uma via respiratória na qual uma outra molécula orgânica ou inorgânica que não oxigênio, (por exemplo, nitrato, fumarato, dimetilsulfoxido, compostos de enxofre tais como, sulfato, e óxidos metálicos) seja o acceptor de elétron final. A expressão “via respiratória anaeróbica” é utilizada aqui permutavelmente com a expressão “metabolismo anaeróbico” e “respiração anaeróbica”.

“Respiração anaeróbica” deve ser distinguida de “fermentação”. Na “fermentação”, NADH doa seus elétrons a uma molécula produzida pela mesma via metabólica que produziu os elétrons realizados em NADH. Por exemplo, em uma das séries de reações químicas fermentativas do *E. coli*, o NADH gerado através da glicólise transfere seus elétrons para piruvato, rendendo lactato.

Um microorganismo operando sob condições fermentativas só pode metabolizar uma fonte de carbono, se a fermentação for “equilibrada”. A fermentação é dito ser “equilibrada”, quando o NADH produzido durante as reações de oxidação da fonte de carbono é igual ao NADH utilizado para converter acetil-CoA à fermentação dos produtos finais. Somente sob estas condições todo o NADH é reciclado. Sem reciclagem, o raio $\text{NADH} / \text{NAD}^+$ se torna desequilibrado o que leva o organismo a morrer, em última instância, a menos que séries de reações químicas metabólicas estejam disponíveis para manter um equilíbrio do raio $\text{NADH} / \text{NAD}^+$. Uma prova escrita de fermentação é dito ser “equilibrada”, quando os hidrogênios produzidos durante as oxidações são iguais a hidrogênios transferidos para a fermentação dos produtos finais. Somente sob estas condições é todo o NADH e reduziu ferredoxina reciclada para formas oxidadas. É importante saber se uma fermentação é equilibrada, porque, se não for, então a reação global escrita está incorreta.

Condições anaeróbicas são preferidas para um alto rendimento de n-butanol produ-

zindo microorganismos.

A Figura 2 ilustra uma série de reações químicas em levedura que converte uma fonte de carbono de n-butanol, de acordo com uma modalidade da presente invenção. Este percurso pode ser considerado como tendo duas partes distintas, que incluem (1) conversão de uma fonte de carbono para acetil-CoA, e (2) conversão de acetil-CoA a n-butanol. Devido à compartimentação das reações metabólicas em leveduras (e outros eucarióticos) e para assegurar a geração de acetil-CoA adequada a partir da glicose para conduzir a segunda parte do percurso, a produção de acetil-CoA no citosol é necessária e, portanto, aumentou em certas variantes projetadas descritas aqui divulgadas.

Relevante à parte (1) da conversão de uma fonte de carbono para butanol, um microorganismo da levedura pode ser projetado para elevar o fluxo de piruvato a acetil-CoA no citosol.

Conforme mostrado na figura 3, *S. cerevisiae* gera acetil-CoA na mitocôndria e no citosol. Uma vez que a conversão de acetil-CoA a n-butanol participa no citosol, a geração de acetil-CoA no citosol é aumentada na celular projetada. Opcionalmente, a geração de acetil-CoA no mitocôndrio pode ser reduzida ou reprimida.

Em uma modalidade, o acetil-CoA pode ser gerado a partir de piruvato pelo aumento do fluxo através da "passagem secundária de desidrogenase piruvato" citosólica (Prank et al.(1996). Levedura 12 (16): 1607), conforme ilustrado na figura 3, Etapas 1 a 3. Para aumentar o fluxo por essa rota, uma ou mais das enzimas de piruvato descarboxilase (PDC), aldeído desidrogenase (ALD) e acetil-CoA sintase (ACS), pode ser superexpressada.

Esta manipulação de aumentar a atividade ou o fluxo da rota da "passagem secundária de PDH" pode resultar na obtenção de um rendimento de butanol de mais de 5% do máximo teórico.

Uma vez que esta rota da produção de acetil-CoA gera acetaldeído como um intermediário, é preferível minimizar o desvio de acetaldeído em percursos distantes da síntese de acetil-CoA, principalmente, a redução adicional do acetaldeído a etanol pela atividade das enzimas de álcool desidrogenase (ADH). Portanto, reduzir ou eliminar a atividade de ADH pode aumentar a geração de acetil-CoA através da série de reações químicas na passagem secundária de desidrogenase de piruvato.

Como um exemplo, o genoma da levedura Crabtree positivo do *Saccharomyces cerevisiae* contém 7 ADH genes conhecidos. Destes, ADH1 é a fonte predominante de atividade ADH citosólica, e células suprimidas por ADH1 não são capazes de crescer anaerobicamente (Drewke et al., (1990). J. Bacteriology 172 (7): 3909) Deste modo, ADH1 pode ser preferencialmente suprimido para minimizar a conversão de acetaldeído a etanol. No entanto, outras isoformas ADH podem catalisar a redução de acetaldeído a etanol, e é contemplada a sua redução ou supressão também.

Esta manipulação de diminuir o acetaldeído convertido para o etanol, independentemente ou em combinação com o acima descrito aumento do fluxo da "passagem secundária de PDH" pode resultar na obtenção de um rendimento de butanol de mais de 10% do máximo teórico.

5 Além disso, piruvato desidrogenase catalisa a conversão direta de piruvato a acetil-CoA e CO_2 , enquanto reduz NAD^+ para NADH. Assim, em determinadas modalidades, um piruvato desidrogenase é superexpressado no citosol da levedura. Alternativamente, o piruvato é convertido em formiato e acetil-CoA, e o formiato resultante é ainda metabolizado para CO_2 pela atividade de formiato desidrogenase, que também reduz NAD^+ para NADH.

10 Uma vez que a produção das rotas de acetil-CoA acima-mencionadas utiliza piruvato como um substrato, é preferível minimizar o desvio de piruvato em outros percursos metabólicos. A atividade do Piruvato descarboxilase (PDC) representa uma importante rota citoplasmática do metabolismo de piruvato. Portanto, reduzir ou eliminar as atividades de PDC pode aumentar ainda a geração de acetil-CoA pelas rotas acima-mencionadas

15 A manipulação dos percursos metabólicos para converter piruvato a acetil-CoA, em combinação com a eliminação da atividade de PDC (eliminando, assim, a rota de "passagem secundária de PDH") pode alcançar um rendimento de butanol de mais de 50% do máximo teórico. Essa melhora é o resultado de três importantes manipulações dos percursos metabólicos nativos das células de levedura: (1) eliminar a perda de carbono através da
20 produção de etanol; (2) eliminar uma atividade energeticamente dispendiosa da sintetase de acetil-CoA nas células; e (3) equilibrando a produção e o consumo de co-fatores (por exemplo, NAD^+ / NADH) para todo o percurso envolvido na conversão de glicose para butanol (4 NADH produzidos a partir de glicose para acetil-CoA e 4 NADH consumidos através do acetil-CoA para a conversão do butanol). As últimas duas manipulações irão contribuir principal-
25 mente para o aumento do rendimento elevando a capacidade metabólica global de células hospedeiras de levedura, facilitando assim a função do percurso do butanol tornando ATP, disponível para processos biossintéticos e reduzir o desequilíbrio do raio NAD^+ / NADH na célula.

30 Relevante à parte (2) de converter uma fonte de carbono para butanol, uma levedura pode ser projetada para converter acetil-CoA para butanol.

Em uma modalidade ilustrada, acetil-CoA é convertido para acetoacetil-CoA pela acetil-CoA-acetiltransferase, acetoacetil-CoA é convertido para hidroxibutiril-CoA por hidroxibutiril-CoA desidrogenase, hidroxibutiril-CoA é convertido para crotonil-CoA por crotonase, crotonil-CoA é convertido para butiril-CoA por butiril-CoA desidrogenase (bcd). Bcd exige a
35 presença e a atividade de proteínas de transferência de elétrons (etfA e etfB), a fim de acoplar a redução de crotonil-CoA para a oxidação do NADH. Butiril-CoA é então convertido para butiraldeído e butiraldeído é convertido para butanol por butiraldeído desidrogenase /

butanol desidrogenase. As enzimas podem ser de *C. acetobutylicum*.

Um exemplo da segunda parte do percurso para a conversão de acetil-CoA a n-butanol utilizando uma série de reações químicas anormais expressas com os genes de bactérias solventogenic, por exemplo, de espécie *Clostridium*, é descrita no Pedido de Patente U.S. Nº de série 11/949,724, depositado em 3 de dezembro de 2007, que é incorporado neste documento por referência.

Em algumas modalidades, o microorganismo recombinante pode expressar um ou mais genes anormais que codificam para as enzimas que conferem a capacidade de produção de n-butanol. Por exemplo, microrganismos recombinantes podem expressar genes anormais que codificam um ou mais de um piruvato desidrogenase (PDH) anaerobicamente ativo, Piruvato Formiato liase (PFI), formiato desidrogenase dependente de NADH (FDH), acetil-CoA-acetiltransferase (tiolase), hidroxibutiril-CoA desidrogenase, crotonase, butiril-CoA desidrogenase, desidrogenase butiraldeído, n-butanol desidrogenase, butiraldeído / n-butanol desidrogenase bifuncional. Essas sequências de DNA anormais são preferencialmente obtidas a partir de um microorganismo anormal (tais como *Clostridium acetobutylicum* ou *Clostridium beijerinckii*), e um ou mais destes genes anormais podem ser introduzidos em um hospedeiro adequado utilizando convencionalmente técnicas de biologia molecular. Estas sequências de DNA anormais permitem que microorganismo recombinante produza n-butanol, pelo menos para produção de n-butanol ou o(s) metabolismo(s) intermediário(s) do mesmo em uma quantidade maior que o produzido pelo microorganismo de tipo selvagem homólogo.

Em certas modalidades, o microorganismo recombinante aqui descrito expressa uma Tiolase anormal ou acetil-CoA-acetiltransferase, como uma codificada por um gene *thl* de um *Clostridium*.

Tiolase (E.C. 2.3.1.19) ou acetil-CoA acetiltransferase, é uma enzima que catalisa a condensação de um grupo acetil para uma molécula acetil-CoA. A enzima é, em *C. acetobutylicum*, codificada pelo gene *thl* (GenBank U08465 adesão, proteína AAA82724.1 ID), que foi superexpressada, entre outras enzimas, em *E. coli* sob o seu promotor nativo para a produção de acetona (Bermejo et al., Appl. Environ. Microbiol. 64:1079-1085, 1998). Enzimas homólogas foram também identificadas, e podem ser identificados realizando uma pesquisa BLAST contra a sequência da proteína acima. Estes homólogos também podem servir como tiolases adequadas em um percurso de n-butanol expressa anormalmente. Somente para citar algumas, estas enzimas homólogas incluem, mas não estão limitados a, aquelas de *C. acetobutylicum* sp. (por exemplo, a proteína AAC26026.1 ID), *C. pasteurianum* (por exemplo, a proteína ABA18857.1 ID), *C. beijerinckii* sp. (por exemplo, a proteína ID EAP59904.1 ou EAP59331.1), *Clostridium perfringens* sp. (por exemplo, a proteína ID ABG86544.1, ABG83108.1), *Clostridium difficile* sp. (por exemplo, a proteína ID CAJ67900.1 ou

ZP_01231975.1), *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* (por exemplo, a proteína CAB07500.1 ID), *Thermoanaerobactertengcongensis* (por exemplo, AAM23825.1), *Carboxydotherrmus hydrogenoformans* (por exemplo, a proteína ABB13995.1 ID), *Desulfotomaculum reducens* MI -1 (por exemplo, a proteína EAR45123.1 ID), *Candida tropicalis* (por exemplo, a proteína ID BAA02716.1 ou BAA02715.1), *Saccharomyces cerevisiae* (por exemplo, a proteína ID AAA62378.1 ou CAA30788.1), *Bacillus* sp., *Megasphaera elsdenii*, e *Butyrivibrio fibrisolvens*. Além disso, o endógeno *S. cerevisiae* tiolase poderia também ser ativo em um percurso de n-butanol anomamente expressas (ScERG10).

Homólogos partilhando, pelo menos, cerca de 55%, 60%, 65%, 70%, 75% ou 80% sequência de identidade, ou, pelo menos, cerca de 65%, 70%, 80% ou 90% sequência homóloga, conforme calculado pelo NCBI's BLAST, são tiolase homóloga adequada que podem ser utilizados em microorganismos recombinantes da presente invenção. Tais homólogos incluem, mas não estão limitados a, *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 (ZP_00909576.1 ou ZP_00909989.1), *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 (NP_149242.1), *Clostridium tetani* E88 (NP_781017.1), *Clostridium perfringens* str. 13 (NP_563111.1), *Clostridium perfringens* SM101 (YP_699470.1), *Clostridium pasteurianum* (ABA18857.1), *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* (CAB04793.1), *Clostridium difficile* QCD-32g58 (ZP_01231975.1), e *Clostridium difficile* 630 (CAJ67900.1).

Em certas modalidades, microorganismos recombinantes da presente invenção expressam uma 3-hidroxibutiril-CoA desidrogenase anormal, tal como uma codificada por um gene hbd de um *Clostridium*.

O 3-hidroxibutiril-CoA desidrogenase (BHBD) é uma enzima que catalisa a conversão de acetoacetil-CoA a 3-hidroxibutiril-CoA. Existem diferentes variantes desta enzima que produzem o (S) ou o (R) do isômero 3 -hidroxibutiril-CoA. Enzimas homólogas podem ser facilmente identificadas por um versado na técnica, por exemplo, realizando uma pesquisa BLAST contra o acima-mencionado *C. acetobutylicum* BHBD. Todas estas enzimas homólogas poderiam servir como um BHBD em um percurso do n-butanol expresso de forma anormal. Estas enzimas homólogas incluem, mas não estão limitadas a: *Clostridium kluyveri*, que expressa duas formas distintas desta enzima (Miller et al., J. Bacteriol. 138:99-104, 1979), e *Butyrivibrio fibrisolvens*, que contém um gene bhbd que é organizado dentro do mesmo locus do resto do seu percurso de butirato (Asanuma et al. Current Microbiology 51 :91-94, 2005; Asanuma et al. Current Microbiology 47:203-207, 2003). Um gene que codifica para uma cadeia curta acil-CoA desidrogenase (SCAD) foi clonado a partir de *Megasphaera elsdenii* e expressos em *E. coli*. A Atividade *in vitro* pode ser determinada (Becker et al., Bioquímica 32:10736-10742, 1993). Outros homólogos foram identificados em outras espécies de *Clostridium* como o *C. Kluyveri* (Hillmer et al., FEBS Lett. 21 :351-354, 1972; Madan et al. Eur. J. Biochem. 32:51-56, 1973), *C. beijerinckii*, *C. thermosaccharolyticum*, *C.*

tetani.

Em certas modalidades, onde um BHBD é expresso, pode ser benéfico selecionar uma enzima do mesmo organismo thiolase a montante ou crotonase a jusante originários. Isso pode evitar crises de interações proteína-proteína potenciais entre proteínas adjacentes na série de reações químicas, quando as enzimas de diferentes organismos são expressas.

Em certas modalidades, o microorganismo recombinante aqui descrito expressa um crotonase anormal, tal como um codificado por um gene crt de um *Clostridium*.

Crotonases ou enoil-CoA hidratases são enzimas que catalisam a hidratação reversível de substratos cis e trans enoil-CoA para o correspondente derivado de hidroxiaçil β -CoA. Em *C. acetobutylicum*, esta etapa do metabolismo é catalisada por butanoato EC 4.2.1.55, codificada pelo gene crt (proteína GenBank adesão AAA95967, Kanehisa, Novartis Found Symp. 247:91-101, 2002; discussão 01-3, 19-28, 244-52). O crotonase (CRT) de *C. acetobutylicum* foi purificado à homogeneidade e caracterizado (Waterson et al., J. Biol. Chem. 247:5266-5271, 1972). Ele se comporta como uma proteína homogênea em ambos os estados nativo e desnaturado. A enzima parece funcionar como um tetrâmero com peso molecular de uma subunidade de 28,2 kDa e 261 resíduos (Waterson et al. relata uma massa molecular de 40 kDa e um comprimento de 370 resíduos). A enzima purificada perdeu atividade quando armazenada em soluções tampão a 4° C ou quando congelados (Waterson et al., J. Biol. Chem. 247:5266-5271, 1972). O pH ótimo para a enzima é pH 8,4 (Schomburg et al., Nucleic Acids Res. 32: D431-433, 2004). Ao contrário dos mamíferos crotonases que têm uma ampla especificidade de substrato, a enzima bacteriana hidrata apenas crotonil-CoA e hexenoil-CoA. Os valores de $V_{\max}$ e K_m de $6,5 \times 10^6$ mol por minuto por mol e 3×10^{-5} M foram obtidos para crotonil-CoA. A enzima é inibida pelas concentrações de crotonil-CoA mais elevadas do que 7×10^5 M (Waterson et al. J. Biol. Chem. 247:5252-5257, 1972; Waterson et al., J. Biol. Chem. 247:5258-5265, 1972).

As estruturas de muitas das famílias crotonase de enzimas têm sido resolvidos (Engel et al., J. Mol. Biol. 275:847-859, 1998). O gene Crt é altamente expresso em *E. coli* e exibe uma atividade específica maior do que em *C. acetobutylicum* (187,5 U/mg de mais de 128,6 U/mg) (Boynton et al., J. Bacteriol. 178:3015-3024, 1996). Uma série de diferentes homólogos de crotonase é codificada em eucarióticos e procarióticos que funcionam como parte do metabolismo do butanoato, síntese de ácidos graxos, β -oxidação e outros percursos relacionados (Kanehisa, Novartis Found Symp. 247:91-101, 2002; discussão 01-3, 19-28, 244-52; Schomburg et al., Nucleic Acids Res. 32: D431-433, 2003). Algumas dessas enzimas têm sido bem-estudadas. Enoil-CoA hidratase proveniente de fígado bovino é extremamente bem-estudado e pelo todo caracterizado (Waterson et al., J. Biol. Chem. 247:5252-5257, 1972). Um alinhamento ClustalW de 20 mais orthologs próximos de crotonase é gerado a partir de bactérias. Os homólogos variam em sequência de identidade 40 a

85%.

Homólogos partilhando, pelo menos, cerca de 45%, 50%, 55%, 60%, 65% ou 70% da sequência de identidade, ou, pelo menos, cerca de 55%, 65%, 75% ou 85% sequência homóloga, conforme calculado pelo NCBI's BLAST, são homólogos Crt adequáveis que podem ser utilizados em microorganismos recombinantes da presente invenção. Tais homólogos incluem, mas não estão limitados a, *Clostridium tetani* E88 (NP_782956.1), *Clostridium perfringens* SM101 (YP_699562.1), *Clostridium perfringens* str. 13 (NP_563217.1), *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 (ZP_00909698.1 ou ZP_00910124.1), *Syntrophomonas wolfei* subsp. *wolfei* str. Goettingen (YP_754604.1), *Desulfotomaculum reducens* IA-1 (ZP_01147473.1 ou ZP_01149651.1), *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* (CAB07495.1), e *Carboxydotherrmus hydrogenoformans* Z-2901 (YP_360429.1).

Estudos em *Clostridia* demonstram que o gene *crt* que codifica para crotonase é codificado como parte da maior BCS operon. No entanto, os estudos sobre *B. fibriosolvens*, um butirato produzindo uma bactéria do rúmen, mostra um arranjo estritamente diferente. Enquanto o Tipo I *B. fibriosolvens* tem os genes *thl*, *crt*, *hbd*, *bcd*, *etfA* e *etfB* agrupados e organizados como parte de um operon, as espécies do Tipo II têm um cluster semelhante, mas falta o gene *crt* (Asanuma et al., Curr. Microbiol. 51 :91-94, 2005; Asanuma et al., Curr. Microbiol. 47:203-207, 2003). Uma vez que a proteína está bem-expressa em *E. coli* e pelo todo caracterizada, a enzima *C. acetobutylicum* é a para a enzima preferida para o percurso do n-butanol expresso de forma anormal. Outros possíveis alvos são genes homólogos de *Fusobacterium nucleatum* subsp. *Vincentii* (Q7P3U9-Q7P3U9_FUSNV), *Clostridium difficile* (P45361-CRT-CLODI), *Clostridium pasteurianum* (P81357-CRT_CLOPA) e *Brucella melitensis* (Q8YDG2-Q8YDG2_BRUME). [0091] Em certas modalidades, o microorganismo recombinante aqui descrito manifesta um butiril-CoA desidrogenase anormal e, se necessário, as proteínas correspondentes da transferência de elétrons, tais como codificadas pelos genes *bcd*, *etfA*, e *etfB* de um *Clostridium*.

O *C. acetobutylicum* butiril-CoA desidrogenase (*bcd*) é uma enzima que catalisa a redução da dupla ligação carbono-carbono em crotonil-CoA para render butiril-CoA. Esta redução está associada à oxidação do NADH. No entanto, a enzima exige duas proteínas de transferência de elétrons *etfA* e *etfB* (Bennett et al. Ferns Microbiology Reviews 17:241-249, 1995).

O gene *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 que codifica as enzimas beta-hidroxibutiril-coenzima A (CoA) desidrogenase, crotonase e butiril-CoA desidrogenase estão agrupadas no BCS operon, cujo número de acesso GenBank é U17110.

A sequência de proteína de butiril-CoA desidrogenase (*bcd*) (No. de acesso GENBANK AAA95968.1) é dado em SEQ ID No: 3.

Homólogos partilhando, pelo menos, cerca de 55%, 60%, 65%, 70%, 75% ou 80%

da sequência de identidade, ou, pelo menos, cerca de 70%, 80%, 85% ou 90% da sequência homóloga, conforme calculado pelo NCBI's BLAST, são homólogos Bcd adequáveis que podem ser utilizados em microorganismos recombinantes da presente invenção. Tais homólogos incluem, mas não estão limitados a, *Clostridium tetani* E88 (NP_782955.1 ou NP_781376.1), *Clostridium perfringens* str. 13 (NP_563216.1), *Clostridium beijerinckii* (AF494018_2), *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 (ZP_00910125.1 ou ZP_00909697.1), e *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* (CAB07496.1), *Thermoanaerobacter tengcongensis* MB4 (NP_622217.1).

Homólogos partilhando, pelo menos, cerca de 45%, 50%, 55%, 60%, 65% ou 70% da sequência de identidade, ou, pelo menos, cerca de 60%, 70%, 80% ou 90% da sequência homóloga, conforme calculado pelo NCBI's BLAST, são homólogos Hbd adequáveis que podem ser utilizados no microorganismo recombinante aqui descritos. Tais homólogos incluem, mas não estão limitados a, *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 (NP_349314.1), *Clostridium tetani* E88 (NP_782952.1), *Clostridium perfringens* SM101 (YP_699558.1), *Clostridium perfringens* str. 13 (NP_563213.1), *Clostridium saccharobutylicum* (AAA23208.1), *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 (ZP_00910128.1), *Clostridium beijerinckii* (AF494018_5), *Thermoanaerobacter tengcongensis* MB4 (NP_622220.1), *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* (CAB04792.1), e *Alkaliphilus metalliredigenes* QYMF (ZP_00802337.1).

A K_m de Bcd para butiril-CoA é 5. *C. acetobutylicum* bcd e os genes que codificam as respectivas ETFs tem sido clonados em um vetor aleatório de *E. coli*-*acetobutylicum* C. A atividade elevada de Bcd foi detectada em *C. acetobutylicum* ATCC 824 transformada com este plasmídeo (Boynton et al., *Journal of Bacteriology* 178:3015-3024, 1996). A k_m do *C. acetobutylicum* P262 Bcd para butiril-CoA é de aproximadamente 6 μ M (DiezGonzalez et al. *Current Microbiology* 34:162-166, 1997). Homólogos de Bcd e os respectivos ETFs foram identificados na produção de butirato de *Megasphaera elsdenii* (Williamson et al. *Biochemical Journal* 218:521-529, 1984), *Peptostreptococcus elsdenii* (Engel et al. *Biochemical Journal* 125:879, 1971), *Syntrophospira bryanti* (Dong et al., *Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 67:345-350, 1995), e *Treponema phagedemes* (George et al., *Journal of Bacteriology* 152:1049-1059, 1982) anaeróbios. A estrutura da *M. elsdenii* Bcd foi resolvido (Djordjevic et al., *Biochemistry* 34:2163-2171, 1995). Uma pesquisa BLAST de *C. acetobutylicum* ATCC 824 Bcd identificou uma grande quantidade de sequências homólogas de uma ampla variedade de espécies, algumas dos homólogos estão listados acima. Qualquer um dos genes que codificam esses homólogos pode ser utilizado para a presente invenção. Note-se que a expressão questões, questões de transferência de elétrons, ou ambas as questões, podem surgir quando de forma anormal expressar esses genes em um microorganismo (tal como o *E. coli*), mas não em outro. Além

disso, uma enzima homóloga pode ter expressão e/ou a questão de transferência de elétrons em um determinado microrganismo, mas outras enzimas homólogas não podem. A disponibilidade de genes diferentes, em grande medida equivalente fornece mais opções de projeto quando projetando o microrganismo recombinante.

Um promissor bcd que já foi clonado e expresso em *E. coli* é de *Megasphaera elsdenii*, e a atividade in vitro da enzima expressa poderia ser determinada (Becker et al., Bioquímica 32:10736-10742, 1993). O'Neill et al. relatou a clonagem e expressão anormal em *E. coli* do gene *etfA* e *etfB* e caracterização funcional das proteínas codificadas de *Megasphaera elsdenii* (O'Neill et al., J. Biol. Chem. 273:21015-21024, 1998). A atividade foi medida com o ensaio ETF que acopla a oxidação NADH para a redução de crotonil-CoA via Bcd. A atividade d ETF recombinante no ensaio FEF com Bcd é semelhante ao da enzima nativa como relatado por Whitfield e Mayhew. Portanto, utilizar a *Megasphaera elsdenii* Bcd e as suas proteínas ETF fornece uma solução para sintetizar butiril-CoA. O k_m da *M. elsdenii* Bcd foi medido como 5 μ M quando expresso de forma recombinante, e 14 μ M quando expresso no hospedeiro nativo (Duplessis et al. 37:10469-77 Bioquímica, 1998). *M. elsdenii* Bcd parece ser inibida por acetoacetato em concentrações extremamente baixas (K_i - de 0,1 M) (Vanberkel et al. Eur. J. Biochem. 178:197-207, 1988). Um gene cluster contendo *thl*, *crt*, *hbd*, *bcd*, *etfA*, e *etfB* foi identificado em dois butiratos produzindo espécies de *Butyrivibrio fibrisolvens*. A similaridade da sequência de aminoácidos destas proteínas é alto, em comparação com *Clostridium acetobutylicum* (Asanuma et al. Current Microbiology 51 :91-94, 2005; Asanuma et al. Current Microbiology 47:203-207, 2003). Nos sistemas de mamíferos, uma enzima similar, envolvida na oxidação de ácidos graxos de cadeia curta é encontrada nas mitocôndrias.

Em certas modalidades, o microrganismo recombinante aqui descrito expressa uma "trans-2-enoil-CoA redutase" ou "TER" anormal.

Trans-2-enoil-CoA redutase ou TER é uma proteína que é capaz de catalisar a conversão de crotonil-CoA para butiril-CoA. Em certas modalidades, o microrganismo recombinante expressa um TER que catalisa a mesma reação que *bcd* / *EtfA* / *EtfB* de *Clostridia* e outras espécies bacterianas. TER mitocondrial de *E. gracilis* tem sido descrita, e muitas proteínas TER e proteínas com atividade TER derivada de um número de espécies foram identificadas formando uma família de proteína TER (Pat. Appl. U.S. 2007/0022497 para Cirpus et al.; Hoffmeister et al., J. Biol. Chem., 280:4329-4338, 2005, ambas as quais são incorporadas na íntegra por referência neste documento). A cDNA truncado do gene *E. gracilis* foi funcionalmente expressado em *E. coli*. Este cDNA ou os genes dos homólogos de outros microrganismos podem ser expressos em conjunto com o percurso de n-butanol genes *THL*, *crt*, *adhE2*, e *hbd* para produzir n-butanol em *E. coli*, *S. cerevisiae* ou outros hospedeiros.

Proteínas TER também podem ser identificadas por métodos de bioinformática geralmente bem-conhecidos, tal como BLAST. Exemplos de proteínas TER incluem, mas não estão limitados a, capítulos de espécies, tais como: *Euglena* spp. incluindo, mas não se limitando a, *E. gracilis*, *Aeromonas* spp. incluindo, mas não limitados, a *A. hydrophila*, *Psychromonas* spp. incluindo, mas não se limitando a, *p. ingrahamii*, *Photobacterium* spp. incluindo, mas não limitados, a *P. profundum*, *Vibrio* spp. incluindo, mas não limitados, a *V. angustum*, *V. cholerae*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. fischeri*, *V. splendidus*, *Shewanella* spp. incluindo, mas não se limitando a, *S. amazonensis*, *S. woodyi*, *S. frigidimarina*, *S. paeleana*, *S. baltica*, *S. denitrificans*, *Oceanospirillum* spp. *Xanthomonas* spp. incluindo, mas não se limitando a, *X. oryzae*, *X. campestris*, *Chromohalobacter* spp. incluindo, mas não limitados, a *C. salexigens*, *Idiomarina* spp. incluindo, mas não limitados, a *I. baltica*, *Pseudoalteromonas* spp. incluindo, mas não se limitando a, *P. atlantica*, *Alteromonas* spp. *Saccharophagus* spp. incluindo, mas não se limitando a, *S. degradans*, *S. marinho proteobacterium gamma*, *S. alpha proteobacterium*, *Pseudomonas* spp. incluindo, mas não se limitando a, *P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. fluorescens*, *Burkholderia* spp. incluindo, mas não se limitando a, *B. phytofirmans*, *B. cenoespéciecia*, *B. espéciecia*, *B. ambifaria*, *B. vietnamensis*, *B. multivorans*, *B. dolosa*, *Methylobacillus* spp. incluindo, mas não se limitando a, *M. flagelatus*, *Stenotrophomonas* spp. incluindo, mas não se limitando a, *S. maltophilia*, *Congregibacter* spp. incluindo, mas não se limitando a, *C. litoralis*, *Serratia* spp. incluindo, mas não se limitando a, *S. proteamaculans*, *Marinomonas* spp. *Xytella* spp. incluindo, mas não se limitando a, *X. fastidiosa*, *Reinekea* spp. *Colwellia* spp. incluindo, mas não se limitando a, *C. psychrerythraea*, *Yersinia* spp. incluindo, mas não se limitando a, *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Methylobacillus* spp. incluindo, mas não se limitando a, *M. flagelatus*, *Cytophaga* spp. incluindo, mas não se limitando a, *C. hutchinsonii*, *Flavobacterium* spp. incluindo, mas não se limitando a, *F. johnsoniae*, *Microscilla* spp. incluindo, mas não se limitando a, *M. marina*, *Polaribacter* spp. incluindo, mas não se limitando a, *p. irgensii*, *Clostridium* spp. incluindo, mas não se limitando a, *C. acetobutylicum*, *C. beijerenckii*, *C. cellulolyticum*, *Coxiella* spp. incluindo, mas não se limitando a, *C. burnetii*.

Além do exposto, os termos "trans-2-enoil-CoA redutase" ou "TER" referem-se a proteínas que são capazes de catalisar a conversão de crotonil-CoA para butiril-CoA e que partilham, pelo menos, cerca de 40 %, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais de sequência de identidade ou, pelo menos, cerca de 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais de similaridade da sequência, conforme calculado pelo NCBI BLAST, utilizando parâmetros padrão, para um ou por ambos os *E. gracilis* TER truncados ou a totalidade do comprimento de *A. hydrophila* TER.

Conforme utilizado aqui, "sequência de identidade" refere-se à ocorrência de exa-

tamente o mesmo nucleotídeo ou aminoácido na mesma posição em sequências alinhadas. "Sequência de similaridade" leva jogos aproximados em conta, e só faz sentido quando tais substituições são pontuadas de acordo com um certo grau de "diferença" ou "semelhança" com substituições conservadoras ou muito prováveis atribuídas a pontuações mais favoráveis que os não-conservadores ou improváveis.

Outra vantagem da utilização do TER, ao invés de bcd / EtfA / EtfB ser aquele TER é ativo como um monômero e nem a expressão da proteína, nem a própria enzima é sensível ao oxigênio.

Conforme utilizado aqui, "trans-2-enoil-CoA redutase (TER) homólogo" refere-se a uma polipeptídios de enzima homóloga de outros organismos, por exemplo, pertencente ao filo Euglena ou Aeromonas, que têm as mesmas características essenciais do TER como acima definido, mas partilha menos que 40% da sequência de identidade e 50% da sequência de similaridade padrão conforme discutido acima. Mutações engloba substituições, acréscimos, supressões, inversões ou inserções de um ou mais resíduos de aminoácidos. Isto permite que a expressão da enzima durante uma fase aeróbia cresça e a fase de expressão do processo do n-butanol, que poderia potencialmente permitir para um ou mais processos eficientes de produção de biocombustível.

Em certas modalidades, o microorganismo recombinante aqui descrito manifesta um butiraldeído desidrogenase / n-butanol desidrogenase anormais, tal como codificadas pelos genes bdhA / bdhB, aad, ou adhE2 de uma Clostridium.

O butiraldeído desidrogenase (BYDH) é uma enzima que catalisa a redução dependente de NADH de butiril-CoA para butiraldeído. Butiraldeído é ainda reduzido a n-butanol por um n-butanol desidrogenase (BDH). Esta redução é também acompanhada pela oxidação de NADH. Clostridium acetobutylicum contém genes de várias enzimas que têm sido mostrados para converter butiril-CoA a n-butanol.

Uma destas enzimas é codificada por aad (Nair et al., J. Bacteriol. 176:871 - 885, 1994). Este gene é referido como adhE em espécie de C. acetobutylicum DSM 792. A enzima faz parte do operon sol e que codifica para uma BYDH / BDH bifuncional (Fischer et al., Journal of Bacteriology 175 :6959-6969, 1993; Nair et al., J. Bacteriol. 176:871 - 885, 1994).

O produto do gene aad foi funcionalmente expressado em *E. coli*. No entanto, em condições aeróbias, a atividade resultante manteve-se muito baixa, indicando sensibilidade ao oxigênio. Com um superior a 100 vezes maior em comparação à atividade para butiraldeído acetaldeído, o principal papel da Aad está na formação de n-butanol em vez de etanol (Hair et al., Journal of Bacteriology 176:5843-5846, 1994).

Homólogos partilhando, pelo menos, cerca de 50%, 55%, 60% ou 65% da sequência de identidade, ou, pelo menos, cerca de 70%, 75% ou 80% da sequência homóloga, conforme calculado pelo NCBI BLAST's, são homólogos adequáveis que podem ser utiliza-

dos nos microorganismos recombinantes aqui descritos. Tais homólogos incluem (sem limitação): *Clostridium tetani* E88 (NP_781989.1), *Clostridium perfringens* str. 13 (NP_563447.1), *Clostridium perfringens* ATCC 13124 (YP_697219.1), *Clostridium perfringens* SM101 (YP_699787.1), *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 (ZP_00910108.1), *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 (NP_149199.1), *Clostridium difficile* 630 (CAJ69859.1), *Clostridium difficile* QCD-32g58 (ZP_01229976.1), e *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 (ZP_00504828.1).

Dois n-butanol desidrogenases dependentes de NADH adicionais de (BDH I, II BDH) têm sido purificados, e seus genes (*bdhA*, *bdhB*) clonados. A adesão GenBank para BDH I é AAA23206.1, e a sequência de proteínas é dada em SEQ ID NO: 10.

A adesão GenBank para BDH II é AAA23207.1, e a sequência de proteínas é dada em SEQ ID NO: 11.

Estes genes são adjacentes no cromossomo, mas são transcritas pelos seus próprios promotores (Walter et al., Gene 134:107-111, 1993). BDH utiliza NADPH como cofator, enquanto BDH II utiliza NADH. No entanto, é notado que a relativa preferência do cofator é dependente de pH. A atividade de BDH I foi observada em *E. coli* expressando *bdhA* lisados depois de um plasmídeo (Petersen et al., Journal of Bacteriology 173:1831 - 1834, 1991). BDH II foi relatado ter uma atividade 46 vezes maior com butiraldeído do que com acetaldeído e é 50 vezes menos ativo na direção inversa. BDH I é apenas cerca de duas vezes mais ativos com butiraldeído do que com acetaldeído (Welch et al., Archives of Biochemistry and Biophysics 273:309-318, 1989). Assim, em uma modalidade, BDH II ou um homólogo do BDH II é utilizado em um percurso de n-butanol expresso de forma anormal. Além disso, estas enzimas são mais ativas sob um pH relativamente baixo de 5,5, traço no qual deve ser levado em consideração quando na escolha de um hospedeiro e/ou condições de processo apropriados.

Enquanto os genes acima-mencionados são transcritos em condições solventogênicas, um outro gene, *adhE2* está transcrito sob condições alcoologênicas (Fontaine et al., J. Bacteriol. 184:821-830, 2002, adesão GenBank No. AF321779). Essas condições estão presentes no pH relativamente neutro. A enzima tem sido superexpressada em culturas anaeróbicas de *E. coli* e com altas atividades de BYDH e BDH dependentes de NADH. Em certas modalidades, esta enzima é a enzima preferida. A sequência de proteína desta enzima (adesão GenBank No. AAK09379.1) é listada como SEQ ID NO: 1.

Homólogos partilhando, pelo menos, cerca de 50%, 55%, 60% ou 65% da sequência de identidade, ou, pelo menos, cerca de 70%, 75% ou 80% da sequência homóloga, conforme calculado pelo NCBI BLAST's, são homólogos adequáveis que podem ser utilizados nos microorganismos recombinantes aqui descritos. Tais homólogos incluem, mas não estão limitados a, *Clostridium perfringens* SM101 (YP_699787.1), *Clostridium perfringens*

str. 13 (NP_563447.1), *Clostridium perfringens* ATCC 13124 (YP_697219.1), *Clostridium*
tetani E88 (NP_781989.1), *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 (ZP_00910108.1), *Clostridi-*
um difficile QCD-32g58 (ZP_01229976.1), *Clostridium difficile* 630 (CAJ69859.1), *Clostridi-*
um acetobutylicum ATCC 824 (NP_149325.1), e *Clostridium thermocellum* ATCC 27405
 5 (ZP_00504828.1).

Em certas modalidades, quaisquer enzimas homólogas que são pelo menos cerca
 de 70%, 80%, 90%, 95%, 99% idênticas, ou partilham, pelo menos, cerca de 60%, 70%,
 80%, 90%, 95% da sequência homóloga (semelhante) a quaisquer dos polipeptídios acima
 pode ser usado no lugar desses polipeptídios tipo selvagem. Estas enzimas que partilham a
 10 sequência de identidade ou de similaridade necessária podem ser enzimas tipo selvagem a
 partir de um organismo diferente, ou podem ser enzimas recombinantes artificiais.

Em certas modalidades, quaisquer genes que codificam para as enzimas com a
 mesma atividade como quaisquer das enzimas acima podem ser utilizadas no lugar dos ge-
 nes que codificam as enzimas acima. Estas enzimas podem ser de tipo selvagem enzimas
 15 provenientes de um organismo diferente, ou podem ser enzimas artificiais, recombinantes
 ou projetadas.

Além disso, devido à degeneração inerente do código genético, outras sequências
 de ácidos nucleicos que codificam substancialmente o mesmo ou uma sequência de amino-
 ácidos funcionalmente equivalente também podem ser utilizadas para clonar e expressar o
 20 polinucleotídeo codificando tais enzimas. Como será entendido por aqueles versados na
 técnica, tal enzima pode ser vantajosa para modificar uma sequência de codificação para
 melhorar a sua expressão em um determinado hospedeiro. Os códons que são utilizados
 com mais frequência em uma espécie são chamados códons ótimos, e os que não são utili-
 zados muitas vezes são classificados como códons raros ou de baixa utilização. Os códons
 25 podem ser substituídos para refletir a o uso preferido do códon do hospedeiro, um processo
 por vezes denominado "otimização do códon", ou "controle para indução de espécies de
 códons". A metodologia para otimizar uma sequência nucleotídica de expressão em uma
 planta é fornecida, por exemplo, na Patente U.S. No. 6.015.891, e as referências aí citadas.

Em certas modalidades, o microorganismo recombinante aqui descrito tem uma ou
 30 mais sequências de DNA anormais de um solventogenic *Clostridia*, tais como *Clostridium*
acetobutylicum ou *Clostridium beijerinckii*. Um *Clostridium acetobutylicum* exemplar é espé-
 cie ATCC824, e um *beijerinckii Clostridium* exemplar é a espécie NCIMB 8052.

A expressão dos genes pode ser obtida por meios convencionais de biologia mole-
 cular. Por exemplo, os genes anormais podem estar sob o controle de um promotor induzível
 35 ou um promotor constitutivo. Os genes anormais podem ser integrados em um cromos-
 some do microorganismo hospedeiro, ou existem como um elemento genético extra- cro-
 mossômicos que pode ser repercutido estável ("herdado") para a célula filha. Tais elementos

genéticos extra-cromossômicos (como plasmídeos, BAC, YAC, etc) podem também conter seleção de marcadores que garantam a presença de tais elementos genéticos nas células filhas.

5 Em certas modalidades, o microorganismo recombinante aqui descrito também pode produzir um ou mais intermediários metabólicos do percurso que produz n-butanol, tal como acetoacetil-CoA, hidroxibutiril-CoA, crotonil-CoA, butiril-CoA, ou butiraldeído, e/ou seus derivados, como o butirato.

10 Em algumas modalidades, os microrganismos recombinantes aqui descritos projetados para ativar uma ou mais das enzimas anormais acima-mencionados para produzir n-butanol, produção de n-butanol através de um percurso anormal.

Conforme utilizado aqui, o termo "percurso" refere-se a um processo biológico, incluindo uma ou mais reações químicas controladas enzimaticamente pelo qual um substrato é convertido em um produto. Do mesmo modo, um percurso para a conversão da fonte de carbono em n-butanol é um processo biológico que inclui uma ou mais reações controladas enzimaticamente pela qual a fonte de carbono é convertida em n-butanol. Um "Percurso anormal" refere-se a um percurso em que, pelo menos, uma das, pelo menos, uma ou mais reações químicas é catalisada por pelo menos uma enzima anormal. Por outro lado, um "percurso nativo" refere-se a um percurso onde a uma ou mais reações químicas é catalisada por uma enzima nativa.

20 Em certas modalidades, os microorganismos recombinantes aqui descritos são projetados para ativar um n-butanol produzindo uma série de reações químicas anormais (aqui também indicado como percurso do n-butanol), que compreende: (1) Conversão de 2 acetil-CoA para Acetoacetil-CoA, (2) Conversão de Acetoacetil CoA para Hidroxibutiril-CoA, (3) Conversão de Hidroxibutiril-CoA para Crotonil-CoA, (4) Conversão da Crotonil CoA para butiril-CoA, (5) Conversão de butiraldeído a n-butanol, (ver a ilustração exemplar da figura 2).

A conversão de 2 acetil-CoA para Acetoacetil-CoA pode ser desempenhada por expressar um gene nativo ou anormal codificando para um acetil-CoA-acetil transferase (tiolase) ou Thi no microorganismo recombinante. Tiolases exemplares apropriados no microorganismo recombinante aqui descrito são codificados por thl de *Clostridium acetobutylicum* e, em especial a partir de espécie ATCC824 ou um gene codificando uma enzima homóloga de *C. pasteurianum*, *C. beijerinckii*, em especial a partir da espécie NCIMB 8052 ou espécie BA101, *Candida tropicalis*, *Bacillus spp.* *Megasphaera elsdenii*, ou *Butyrivibrio fibrisolvens*, ou um *E. coli* tiolase selecionados de *fadA* ou *atoB*.

35 A conversão de Acetoacetil CoA para Hidroxibutiril-CoA pode ser desempenhada por expressar um gene nativo ou anormal codificando para hidroxibutiril-CoA desidrogenase Hbd no microorganismo recombinante. Hbd exemplar adequado no microorganismo recom-

binante aqui descrito são codificados por *hbd* de *Clostridium acetobutylicum* e, em especial a partir da espécie ATCC824, ou um gene codificando uma enzima homóloga de *Clostridium kluyveri*, *Clostridium beijerinckii* e, em especial a partir da espécie NCIMB 8052 ou espécie BA101, *Clostridium thermosaccharolyticum*, *Clostridium tetani*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Megasphaera elsdenii*, ou *E. coli* (*fadB*).

A conversão de Hidroxibutiril-CoA para Crotonil-CoA pode ser desempenhada por expressar um gene nativo ou anormal codificando para uma crotonase ou Crt no microorganismo recombinante. Crt exemplar apropriado no microorganismo recombinante aqui descrito são codificados por *crt* de *Clostridium acetobutylicum* e, em especial a partir da espécie ATCC824, ou um gene codificando uma enzima homóloga de *β. fibriosolvens*, *Fusobacterium nucleatum subsp. Vincentii*, *Clostridium difficile*, *Clostridium pasteurianum*, ou *Brucella abortus*.

A conversão de Crotonil CoA para butiril-CoA pode ser desempenhada por expressar um gene nativo ou anormal codificando para uma butiril-CoA desidrogenase no microorganismo recombinante. Butiril-CoA desidrogenases exemplar adequado no microorganismo recombinante aqui descrito são codificados por *bcd* / *etfA* / *etfB* de *Clostridium acetobutylicum* e, em especial a partir da espécie ATCC824, ou um gene codificando uma enzima homóloga de *Megasphaera elsdenii*, *Peptostreptococcus elsdenii*, *Syntrophospora bryanti*, *Treponema phagedemes*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, ou uma mitocôndria de mamífero Bcd homólogo.

A conversão de butiraldeído a n-butanol pode ser desempenhada por expressar um gene nativo ou anormal codificando para uma butiraldeído desidrogenase ou um n-butanol desidrogenase no microorganismo recombinante. Butiraldeído desidrogenase / n-butanol desidrogenase exemplares adequados no microorganismo recombinante aqui descrito são codificados por *bdhA*, *bdhB*, *aad*, ou *adhE2* a partir de *Clostridium acetobutylicum* e, em especial a partir da espécie ATCC824, ou um gene codificando ADH-1, ADH-2, ou ADH-3 a partir de *Clostridium beijerinckii*, em especial a partir da espécie NCIMB 8052 ou espécie BA101.

Em certas modalidades, as enzimas da série de reações químicas metabólica de acetil-CoA a n-butanol são: (i) tiolase (Thl), (ii) hidroxibutiril-CoA desidrogenase (Hbd), (iii) crotonase (Crt), (iv) pelo menos uma de álcool desidrogenase (AdhE2), ou n-butanol desidrogenase (Aad) ou butiraldeído desidrogenase (Ald), juntamente com um monofuncional n-butanol desidrogenase (BdhA / BdhB), e (v) trans-2-enoil-CoA redutase (TER) (Figura 2). Em certas modalidades, o Thi, Hbd, Crt, AdhE2, Ald, BdhA / BdhB e Aad são de *Clostridium*. Em certas modalidades, o *Clostridium* é um *C. acetobutylicum*. Em certas modalidades, o TER é de *Euglena gracilis* ou de *Aeromonas hydrophila*.

Em certas modalidades, um ou mais genes anormais codificam uma ou mais de a-

cetil-CoA-acetiltransferase (tiolase), hidroxibutiril-CoA desidrogenase (*hbd*), crotonase (*crt*) e álcool desidrogenase (*adhE2*), butiril-CoA desidrogenase (*bcd*), butiraldeído desidrogenase (*bdhA* / *bdhB*) I butanol desidrogenase (*aad*), e trans-2-enoil-CoA redutase (TER).

Por exemplo, a acetil-CoA-acetiltransferase (tiolase) pode ser de *thl* *Clostridium acetobutylicum*, ou uma enzima homóloga de *C. pasteurianum*, *Clostridium beijerinckii*, *Candida tropicalis*, *Bacillus sp.*, *Megasphaera elsdenii*, ou *Butyrivibrio fibrisolvens*, ou uma *E. coli* tiolase selecionados a partir de *fadA* ou *atoB*.

A hidroxibutiril-CoA desidrogenase pode ser *hbd* de *C. acetobutylicum*, ou uma enzima homóloga de *Clostridium kluyveri*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium thermosaccharolyticum*, *Clostridium tetani*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Megasphaera elsdenii*, ou *Escherichia coli* (*fadB*).

A crotonase pode ser *crt* de *Clostridium acetobutylicum*, ou uma enzima homóloga de *β. fibrisolvens*, *Fusobacterium nucleatum* subsp. *Vincentii*, *Clostridium difficile*, *Clostridium pasteurianum*, ou *Brucella abortus*.

A butiril-CoA desidrogenase pode ser *bcd* / *etfA* / *etfB* de *Clostridium acetobutylicum*, ou uma enzima homóloga de *Megasphaera elsdenii*, *Peptostreptococcus elsdenii*, *Syntrophospora bryanti*, *Treponema phagedemes*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, ou um homólogo eucariótico mitocondrial *bcd*.

A butiraldeído desidrogenase / butanol desidrogenase pode ser *bdhA*, *bdhB*, *aad*, ou *adhE2* de *Clostridium acetobutylicum*, ou *ADH-1*, *ADH-2*, ou *ADH-3* de *Clostridium beijerinckii*.

A enzima trans-2-enoil-CoA redutase (TER), pode ser proveniente de um *Euglena gracilis* ou um *Aeromonas hydrophila*.

A uma ou mais sequência(s) de DNA anormal pode(m) ser proveniente(s) de um solventogenic *Clostridium* selecionada(s) a partir de *Clostridium acetobutylicum* ou *Clostridium beijerinckii*, ou a partir de *Clostridium difficile*, *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium kluyveri*, *Clostridium thermosaccharolyticum*, *Clostridium tetani*, *Candida tropicalis*, *Bacillus sp.*, *Brucella abortus*, *Megasphaera elsdenii*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Fusobacterium nucleatum* subsp. *Vincentii*, *Peptostreptococcus elsdenii*, *Syntrophospora bryanti*, *Treponema phagedemes*, ou *E. coli*.

Em certas modalidades, o *Clostridium acetobutylicum* é espécie ATCC824, e o *Clostridium beijerinckii* é espécie NCIMB 8052 ou espécie BA101. Em certas modalidades, homólogos partilhando, pelo menos, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% da sequência de identidade, ou, pelo menos, cerca de 50%, 60%, 70%, 80%, 90% da sequência de identidade (como calculado pelo NCBI BLAST, utilizando parâmetros predefinidos) são apropriados para a presente invenção.

Parte (1): Projetando a conversão de piruvato a acetil-CoA

Como descrito acima, a conversão de piruvato a acetil-CoA pode ocorrer em uma célula projetada por duas linhas gerais: (A) a rota da "passagem secundária PDH" tal como acima definida ou (B) a conversão direta de piruvato a acetil-CoA no citosol pelo PDH ou pelo PFL.

5 (A) Geração de acetil-CoA através da rota de "passagem secundária PDH"

Relativas à rota (A), gerando acetil CoA a partir de piruvato, a geração do percurso de acetil-CoA citosólica é catalisada por três enzimas como mostrado na figura 3, etapas 1, 2 e 3. Um percurso mais eficiente para a geração de acetil-CoA é alcançado através do aumento da atividade dessas enzimas que são limitantes em taxa. Por exemplo, em *Saccharomyces cerevisiae*, se a atividade ALD estiver limitando em um percurso, a superexpressão de ALD6 irá, assim, aumentar o fluxo geral através do percurso. A formação elevada de acetil-CoA no citosol é alcançada através de um dos seguintes mecanismos ou uma combinação dos mesmos:

Em uma modalidade, o acetil-CoA elevado pode ser gerado pela superexpressão de um gene piruvato descarboxilase (por exemplo, *S. cerevisiae* *PDC1*, *PDC5* e/ou *PDC6*; Etapa 1).

Em outra modalidade, o acetil-CoA elevado pode ser gerado pela superexpressão de um gene acetaldeído desidrogenase (por exemplo, *S. cerevisiae* *ALD6*; Etapa 2).

Em outra modalidade, o acetil-CoA elevado pode ser produzido pela superexpressão de um gene acetil-CoA sintase (por exemplo, *S. cerevisiae* *ACS1* ou *ACS2* ou ambos; Etapa 3).

Em uma modalidade diferente, a superexpressão simultânea de ambos os ALD e ACS (*S. cerevisiae* *ALD6*; Etapa 2), pode gerar um acetil-CoA elevado (Etapas 2 e 3).

Em outra modalidade, a superexpressão simultânea dos genes PDC, ALD, e ACS podem gerar aumento da produção de acetil-CoA (Etapas 1 a 3).

Para aumentar adicionalmente a produção de acetil-CoA, o principal percurso de produção de etanol citosólico em levedura pode ser reduzido ou eliminado. Em Crabtree positivo, *S. cerevisiae*, isto é alcançado através da supressão do *ADH1* que é a fonte predominante de atividade ADH citosólica. Células suprimidas por *ADH1* são incapazes de crescer de forma anaeróbia (Drewke et al., (1990). J. Bacteriology 172 (7): 3909), e, portanto, podem ser preferencialmente suprimidas para minimizar a conversão de acetaldeído a etanol. A eliminação deste percurso seletivamente conduz acetaldeído em direção ao acetato e, posteriormente, à produção de acetil-CoA (Figura 3, Etapa 5). Portanto, a superexpressão dos genes descrita acima pode ser realizada em uma célula possuindo atividade ADH reduzida ou eliminada

Do mesmo modo, a atividade ADH citosólica pode ser reduzida ou eliminada em uma levedura Crabtree negativa, tal como *Kluyveromyces lactis* pela supressão do *ADH1* ou

ADHII para aumentar o fluxo de piruvato a acetil-CoA através da rota da "passagem secundária PDH". Por isso, neste organismo, semelhante ao que foi proposto a *S. cerevisiae* acima, o fluxo através da "passagem secundária PDH" poderia ser aumentada pelo excesso de expressão de *KIALD6*, *KIACS1* ou *KIACS2* isoladamente ou em combinação.

5 (B) Geração direta de acetil-CoA a partir de piruvato

Relativas à rota (B) de geração de acetil CoA a partir de piruvato, a produção de acetil-CoA pode ser aumentada pela superexpressão dos genes que formam uma completa complexa PDH. Por exemplo, os genes superexpressados podem ser provenientes de *E. coli* (*aceE*, *aceF*, e *lpdA*), *Zymomonas mobilis* (*pdhAct*, *pdhAβ*, *pdhB*, e *lpd*), *S. aureus* (*pdhA*, *pdhB*, *PDHC*, e *lpd*), *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium glutamicum*, ou *Pseudomonas aeruginosa* (Etapa 4).

A enzima piruvato desidrogenase complexo catalisa a conversão de piruvato a acetil-CoA. Em *S. cerevisiae*, este complexo está localizado no espaço interno da membrana mitocondrial. Consequentemente, outro método para a obtenção de níveis mais elevados de acetil-CoA no citoplasma de *S. cerevisiae* é projetar uma célula para superexpressar um complexo de piruvato desidrogenase eucariótico ou procariótico que possa funcionar no citoplasma (Etapa 4). Em certas modalidades, o microorganismo recombinante aqui descrito inclui uma piruvato desidrogenase (PDH) ativa, sob condições anaeróbicas ou microaeróbicas. A piruvato desidrogenase ou formiato desidrogenase dependente de NADH pode ser anormal ao microorganismo recombinante, em que o código da sequência que codifica estas enzimas é anormal, ou a região reguladora transcricional é anormal (incluindo artificiais), ou os polipeptídios codificados compreendem trocas de sequência que tornem a enzima resistente à inibição da realimentação por certos intermediários ou substratos metabólicos.

Até há pouco tempo, era amplamente aceito que Pdh não funcionasse em condições anaeróbicas, mas diversos registros recentes têm demonstrado que este não é o caso (de Graef, M. et al, 1999, Journal of Bacteriology, 181, 2351 -- 57; Vernuri, GN et al, 2002, Applied and Environmental Microbiology, 68, 1715-27). Além disso, outros microrganismos tais como *Enterococcus faecalis* apresentam alta atividade in vivo do complexo Pdh, mesmo sob condições anaeróbicas, forneceu que as condições do crescimento foram tais que o raio de NADH / NAD⁺ em estado-estacionário foi suficientemente baixo (Snoep, JL et al, 1991, Ferns Microbiology Letters, 81, 63-66). Ao invés de oxigênio, que regula a expressão e a função de Pdh, tem sido demonstrado que Pdh é regulamentada pelo raio NADH / NAD⁺ (de Graef, M. et al, 1999, Journal of Bacteriology, 181, 2351-57. Se o percurso de n-butanol expresso em uma célula hospedeira consome NADH rápido o suficiente para manter um baixo nível de NADH / NAD⁺ dentro da célula, uma Pdh endógena ou anormal expressa pode permanecer ativa e prover NADH suficiente para equilibrar o percurso.

Estas enzimas Pdh podem equilibrar o percurso de n-butanol em um microorganism-

mo recombinante aqui descrito.

A expressão de uma Pdh que é funcional sob condições anaeróbias é esperada para aumentar os mols de NADH obtido por mol de glicose. Kim et al. descreve um PDH que torna disponível em *E. coli* até quatro mols de NADH por mol de glicose consumida (Kim, Y. et al. (2007). Appl. Environm. Microbiol., 73, 1766-1771). Células de levedura também podem ser projetadas para expressar Pdh complexa a partir de diversas fontes bacterianas. Por exemplo, Pdh de *Enterococcus faecalis* é semelhante ao Pdh de *E. coli*, mas é desativados a níveis muito menores de NADH / NAD⁺. Além disso, alguns organismos, tais como *Bacillus subtilis* e quase todas as espécies de bactérias do ácido láctico utilizam um Pdh no metabolismo anaeróbio. A expressão de um percurso da produção de n-butanol em um microorganismo expressando uma Pdh que é anaerobicamente ativa é esperada para resultar em rendimentos de n-butanol superiores a 1,4% se o percurso de produção de n-butanol puder competir com percursos fermentativos endógenos.

Alternativamente, o acetil-CoA pode ser produzido no citosol por superexpressar duas enzimas bacterianas, uma piruvato formiato liase (por exemplo, *E. coli pflB*) e uma formiato desidrogenase (por exemplo, *Candida boidinii fdh1*). Usando este percurso, piruvato é convertido em acetil-CoA e formiato. O formiato desidrogenase então catalisa a conversão dependente de NADH de formiato para dióxido de carbono. O resultado líquido destas reações é o mesmo que se piruvato fosse convertido em acetil-CoA pelo complexo de piruvato desidrogenase:



Formiato desidrogenase dependente de NADH (FDH; CE 1.2.1.2) catalisa a oxidação de Formiato para CO₂ e simultaneamente a redução de NAD⁺ para NADH. Fdh pode ser utilizado em conformidade com a presente invenção para aumentar a disponibilidade intracelular de NADH no interior do microorganismo hospedeiro e pode ser utilizado para equilibrar ao percurso de produção de n-butanol no que diz respeito ao NADH. Em particular, uma Fdh dependente de NADH pode ser biologicamente ativada e em particular superexpressada no microorganismo hospedeiro. Na presença deste percurso de formiato desidrogenase recentemente introduzido, um mol de NADH será formado quando um mol de formiato for convertido em dióxido de carbono. Em certas modalidades, no microorganismo nativo um formiato desidrogenase converte formiato a CO₂ e H₂ sem envolvimento de co-fator.

Além disso, qualquer dos genes que codificam enzimas estrangeiras (ou quaisquer outros mencionados neste documento (ou qualquer dos elementos reguladores que controlam ou modulam a expressão do mesmo) pode estar sujeito à evolução dirigida utilizando métodos conhecidos por aqueles versados na técnica. Tal ação permite que aqueles versados na técnica otimizem as enzimas para expressão e atividade na levedura.

Além disso, genes de piruvato descarboxilase, acetil-CoA sintetase, e acetaldeído

desidrogenase de outras espécies fúngicas e bacterianas podem ser expressos para a modulação deste percurso. Uma variedade de organismos poderiam servir como fontes para estas enzimas, incluindo mas não limitados a, *Saccharomyces sp.*, incluindo *S. cerevisiae* mutantes e *S. uvarum*, *Kluyveromyces*, incluindo *K. thermotolerans*, *K. lactis*, e *K. marxianus*, *Pichia*, *Hansenula*, *H. polymorpha* incluindo, *Candidia*, *Trichosporon*, *Yamadazyma*, incluindo *stipitis* Y., *Torulaspora pretoriensis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Cryptococcus sp.*, *Aspergillus sp.*, *Neurospora sp.* ou *Ustilago sp.* Exemplos de piruvato descarboxilase úteis são aqueles provenientes de *Saccharomyces bayanus* (1 PYD), *Candida glabrata*, *K. lactis* (KIPDC1), ou *Aspergillus nidulans* (PDcA) e acetil-CoA sintetase de *Candida albicans*, *Neurospora crassa*, *A. nidulans*, ou *K. lactis* (ACS1), e acetaldeído desidrogenase de *Aspergillus niger* (ALDDH), *C. albicans*, *Cryptococcus neoformans* (aldh). Fontes de enzimas procarióticas que são úteis incluem, mas não estão limitadas a, *E. coli*, *Z. mobilis*, *Bacillus sp.*, *Clostridium sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Lactococcus sp.*, *Enterobacter sp.* e *Salmonella sp.* A melhoria adicional deste percurso pode ser obtida através do projeto destas enzimas para a atividade elevada por mutagênese dirigida por sítio e outros métodos de evolução (que incluem técnicas conhecidas para aqueles versados na técnica).

Procariotas tais como, mas não limitados a, *E. coli*, *Z. mobilis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus sp.*, *Clostridium sp.*, *Corynebacterium sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Lactococcus sp.*, *Enterobacter sp.*, *E. Salmonella sp.*, podem servir como fontes para este complexo de enzima. Por exemplo, complexos de piruvato desidrogenase proveniente de *E. coli* (aceE, aceF, e lpdA), *Z. mobilis* (pdhAalfa, pdhAbeta, pdhB, e lpd), *S. aureus* (pdhA, pdhB, PdhC, e PdhC), *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium glutamicum*, e *Pseudomonas aeruginosa*, podem ser utilizados para esta finalidade.

Métodos para crescimento e manuseio de levedura são bem conhecidos na técnica. Métodos para superexpressar, expressar em vários níveis inferiores, reprimir expressão e suprimir genes em células de levedura são conhecidos na técnica e qualquer método está previsto para o uso para construir as espécies de leveduras do presente.

Qualquer método pode ser utilizado para introduzir uma molécula exógena de ácido nucléico em levedura e muitos desses tais métodos são bem conhecidos por aqueles versados na técnica. Por exemplo, a transformação, eletroporação, conjugação, e fusão de protoplastos são métodos comuns para a introdução de ácido nucléico em células de levedura. Ver, por exemplo, Ito et al., J. Bacteriol. 153:163-168 (1983); Durrens et al., Curr. Genet. 18:7-12 (1990) e Becker e Guarente, Methods in Enzymology 194:182-187 (1991).

Em uma modalidade, a integração de um gene de interesse em um fragmento de DNA ou gene - alvo ocorre de acordo com o princípio da recombinação homóloga. De acordo com esta modalidade, uma fita de integração contendo um módulo compreendendo pelo menos um gene marcador de levedura, com ou sem o gene a ser integrado (módulo inter-

no), é ladeado em ambos os lados por fragmentos de DNA homólogos aos das extremidades do sítio de integração direcionada (sequências de recombinação genética). Depois de transformar a levedura com a casa fita por métodos adequados, uma recombinação homóloga entre as sequências de recombinação genética pode resultar na substituição do módulo interno na região cromossômica entre os dois sítios do genoma correspondente à sequência de recombinação genética da fita de integração.

Em uma modalidade, para supressão de genes, a fita integração pode incluir um marcador apropriado da seleção de levedura ladeado pela sequência de recombinação genética. Em uma modalidade, para a integração de um gene anormal no cromossomo da levedura, a fita de integração inclui o gene anormal sob o controle de um promotor e finalizador adequados, juntamente com o marcador selecionável ladeado pela sequência de recombinação genética. Em uma modalidade, o gene anormal compreende um gene nativo desejado apropriado para aumentar o número de cópias de um gene nativo. O gene marcador de seleção pode ser qualquer gene marcador utilizado na levedura, incluindo, mas não limitados a, genes *URA3* proveniente de *S. cerevisiae* ou um gene homólogo, ou gene resistente à higromicina para complementação auxotrófica ou a seleção baseada na resistência a antibióticos das células transformadas, respectivamente. A sequência de recombinação genética pode ser escolhida à vontade, dependendo do local de integração adequado para a aplicação desejada.

Além disso, em uma modalidade, certos genes marcadores introduzidos são removidos do genoma utilizando técnicas bem-conhecidas para aqueles versados na técnica. Por exemplo, a perda do marcador *URA3* pode ser obtida por plaqueamento *URA3* contendo células em FOA (ácido 5-fluoro-orotico), contendo meios e seleção para colônias resistentes a FOA (Boeke, J. et al, 1984, Mol. Gen. Genet, 197, 345-47).

A molécula exógena de ácido nucléico contida dentro de uma célula de levedura da invenção pode ser mantida dentro dessa célula, sob qualquer forma. Por exemplo, moléculas exógenas de ácidos nucléicos podem ser integradas no genoma da célula ou mantidas em um estado episomal que pode de forma estável ser passado em ("herdado") para a célula filha. Tais elementos genéticos extra-cromossômicos (tais como plasmídeos, etc) podem adicionalmente conter marcadores de seleção que garantam a presença de tais elementos genéticos nas células filhas. Além disso, as células de levedura podem ser transformadas de forma estável ou transitória. Além disso, as células de levedura descritas neste documento podem conter uma única cópia, ou múltiplas cópias, de uma molécula exógena de ácido nucléico particular, como descrito acima.

Métodos para expressar um polipeptídeo de uma molécula exógena de ácido nucléico são bem-conhecidas por aqueles versados na técnica. Esses métodos incluem, sem limitação, a construção de um ácido nucléico tal que um elemento regulador promove a expres-

são de uma sequência de ácido nucléico que codifica o polipeptídio desejado. Normalmente, elementos reguladores são sequências de DNA que regulam a expressão de outras sequências de DNA, em nível de transcrição. Assim, elementos reguladores incluem, sem limitação, promotores, realçadores, e coisas similares. Por exemplo, os genes exógenos podem estar sob o controle de um promotor induzível ou um promotor constitutivo. Além disso, os métodos para expressar um polipeptídio a partir de uma molécula de ácido nucléico exógeno em levedura são bem-conhecidos aos versados na técnica. Por exemplo, construtos de ácidos nucléicos que são capazes de expressar polipeptídios exógenos dentro *Kluyveromyces* (ver, por exemplo, Pat. U.S. Nºs 4,859,596 e 4,943,529, cada uma das quais é incorporada por referência neste documento, na sua totalidade) e *Saccharomyces* (ver, por exemplo, Gelissen et al., Gene 190 (1): 87 ~ 97 (1997)) são bem-conhecidos. Em outra modalidade, elementos anormais de controle podem ser usados para ativar ou reprimir expressão de genes endógenos. Além disso, quando a expressão está a ser reprimida ou eliminada, o gene para a enzima relevante, proteínas ou RNA pode ser eliminada por técnicas de supressão conhecidas.

Tal como descrito aqui, levedura no escopo da descrição pode ser identificada por técnicas específicas de seleção para a enzima particular que está sendo expressa, superexpressada ou reprimida. Métodos para identificar as espécies com o fenótipo desejado são bem-conhecidas por aqueles versados na técnica. Tais métodos incluem, sem limitação, técnicas de hibridização de ácidos nucléicos e PCR tal como a análise do Norte e do Sul, alterou as capacidades de crescimento em um determinado substrato ou na presença de um determinado substrato, um composto químico, um agente de seleção e similares. Em alguns casos, técnicas imunohistoquímica e bioquímica podem ser utilizadas para determinar se uma célula contém um ácido nucléico específico, detectando a expressão do polipeptídio codificado. Por exemplo, um anticorpo possuindo especificidade para uma enzima codificada pode ser utilizado para determinar se uma célula de levedura particular contém ou não enzimas codificadas. Além disso, técnicas bioquímicas podem ser utilizadas para determinar se uma célula contém uma molécula de ácido nucléico codificando um polipeptídio enzimático através da detecção de um produto produzido, como resultado da expressão do polipeptídio enzimático. Por exemplo, transformar uma célula com um vetor de codificação acetil-CoA sintetase e detectar aumento nas concentrações de acetil-CoA citosólico indica que o vetor está tanto presente e que o produto do gene está ativo. Métodos para detectar atividades enzimáticas específicas ou a presença de determinados produtos são bem-conhecidos para aqueles versados na técnica. Por exemplo, a presença de acetil-CoA pode ser determinada conforme descrito por Dalluge et al., Anal. Bioanal. Chem. 374 (5):835-840 (2002).

Células de levedura da presente invenção têm reduzida atividade enzimática, tal como atividade reduzida de álcool desidrogenase. O termo "reduzido", como é utilizado aqui

com respeito a uma célula e a uma atividade enzimática especial se refere a um nível de atividade enzimática menor do que o medido em uma célula de levedura comparável à mesma espécie. Assim, células de levedura com falta da atividade de álcool desidrogenase são consideradas ter reduzida atividade de álcool desidrogenase, uma vez que a maioria, se não todas, as espécies de levedura comparáveis têm pelo menos alguma atividade de álcool desidrogenase. Tais atividades enzimáticas reduzidas podem ser o resultado de uma concentração menor das enzimas, menor atividade específica de uma enzima, ou uma combinação dos mesmos. Muitos diferentes métodos podem ser utilizados para fazer que leveduras tenham a atividade enzimática reduzida. Por exemplo, uma célula de levedura pode ser projetada para ter uma perturbada enzima de codificação locus utilizando mutagênese comum ou tecnologia "knock-out". Ver, por exemplo, *Methods in Yeast Genetics* (edição 1997), Adams, Gottschling, Kaiser, e caules, Cold Spring Harbor Press (1998).

Alternativamente, tecnologia anti-sense pode ser utilizada para reduzir a atividade enzimática. Por exemplo, a levedura pode ser projetada para conter um cDNA que codifica uma molécula anti-sense que evita que uma enzima seja feita. O termo "molécula anti-sense", como utilizado neste documento engloba qualquer molécula de ácido nucléico que contenha sequências que correspondem ao cabo de codificação de um polipeptídeo endógeno. Uma molécula anti-sense pode também ter divisão de sequências (por exemplo, sequências reguladoras). Assim, moléculas anti-sense podem ser oligonucleotídeos ribozimas ou anti-sense. Uma ribozima pode ter qualquer estrutura geral, incluindo, sem limitação, estruturas de grampo para cabelo, cabeça do martelo, ou "axhead", desde a molécula racha RNA.

Levedura possuindo uma atividade enzimática reduzida pode ser identificada por meio de qualquer método. Por exemplo, levedura possuindo atividade reduzida de álcool desidrogenase pode ser facilmente identificada utilizando métodos comuns, por exemplo, medindo formação de etanol, através de cromatografia gasosa.

Em uma modalidade, n-butanol pode ser produzido a partir de uma das espécies metabolicamente projetadas da presente descrição utilizando um processo de duas etapas. Uma vez que níveis elevados de butanol (por exemplo, 1,5% na média e isto geralmente varia por leveduras e espécies) podem ser tóxicos para as células, uma estratégia para obter uma grande quantidade de n-butanol é fazer crescer uma espécie capaz de produzir n-butanol sob condições em que nenhum butanol, ou apenas uma quantidade insignificante, não-tóxica de butanol, é produzido. Esta etapa permite a acumulação de uma grande quantidade de células viáveis, ou seja, uma quantidade significativa de biomassa, que pode então ser deslocado para condições de crescimento sob as quais o n-butanol é produzido. Essa estratégia permite que uma grande quantidade de n-butanol a ser produzida antes que problemas de toxicidade se tornem significativos e o crescimento celular lento. Por exemplo,

as células podem ser cultivadas em condições aeróbias (na qual a produção de n-butanol é suprimida ou ausente) e então deslocadas para condições anaeróbias ou microaeróbicas para a produção de n-butanol (por exemplo, pela ativação dos percursos metabólicos adequados que foram projetados para a espécie em conformidade com a presente invenção).

5 Alternativamente, a expressão das enzimas relevantes pode ser induzível sob controle, por exemplo, promotores sensíveis térmicos ou outra etapa sensíveis térmicos (como a termo-estabilidade da própria enzima), dessa forma a primeira etapa ocorre com o(s) percurso(s) relevante ou enzimas desligadas (isto é, inativa), indução ocorre (por exemplo, deslocamento da temperatura), e n-butanol é produzido. Métodos para tornar induzíveis genes sujeitos a
10 controle são bem-conhecidos. Enzimas termoestáveis são conhecidas ou podem ser selecionados através de métodos conhecidos na técnica. Como em outros processos da descrição, uma vez que o n-butanol é produzido, ele pode ser recuperado em conformidade com uma modalidade.

Processos de recuperação de n-butanol a partir de microorganismos, incluindo as
15 leveduras são descritos no Pedido Provisório U.S. No. de Serial 11/949,724, depositado em 3 de dezembro de 2007, o qual é incorporado neste documento por referência.

Será apreciado por aqueles versados na técnica que diversas omissões, adições e alterações podem ser feitas à invenção descrita acima sem afastar do escopo da invenção, e todas essas modificações e alterações destinam-se a cair no escopo da invenção, tal como definido pelas reivindicações em anexo. Todas as referências, patentes, pedidos de patentes, ou outros documentos citados são aqui incorporados por referência.
20

EXEMPLOS

A tabela 1 lista um conjunto de genes que são descritos nos Exemplos 1 a 38. São dados os primers relevantes (direto e reverso) que podem ser utilizados para ampliar cada
25 gene, bem como a sequência de cada primer. Genes são listados de acordo com as convenções apropriadas de nomenclatura para cada espécie; certos genes como listado são precedidos por duas letras, representando a primeira letra do gênero e espécies de origem para um dado gene. Para certos nomes de genes, o sufixo “-co” é anexado para indicar que um gene sintético otimizado pelo códon foi construído utilizando uso de códon preferido para
30 a bactéria *E. coli*, ou a levedura de *S. cerevisiae*, como indicado no texto.

Tabela 1

Gene	Gene SEQ ID NO:	Nome do Primer	SEQ ID NO:	Sequência Primer
<i>Cb-hbd</i>	155	Gevo-311	42	GAGGTTGTCGACATGAAAAAGATTTTGTACTTGGAG
		Gevo-175	43	AATTGGATCCTTATTTAGAATAATCATAGAATCCT
<i>Cb-crt</i>	156	Gevo-312	44	GTTCTTGTGCGACATGGAATTAATAATGTTATTCTTG
		Gevo-171	45	AATTGGATCCTTATTTATTTTGAAAATCTTTTCTGC
<i>Cb-bcd</i>	157	Gevo-313	46	CAAGAGGTCGACATGAATTTCCAATTAAGTAGAGAAC
		Gevo-314	47	GCGTCCGGATCCCTATCTTAAATGCTTCCTGCG
<i>Cb-ettA</i>	158	Gevo-315	48	CGGAAAGTCGACATGAATATAGCAGATTACAAAGGC
		Gevo-173	49	AATTGGATCCTTATTCAGCGCTCTTTATTTCTTTA
<i>Cb-ettB</i>	159	Gevo-316	50	CAAAATGTCGACATGAATATAGTAGTTTGTGTAAAC
		Gevo-317	51	TAATTTGGATCCTTAGATGTAGTGTTTTCTTTAAT
<i>Cb-adhA</i>	160	Gevo-319	52	GAACCAGTCGACATGGCACGTTTTACTTTACCAAG
		Gevo-177	53	AATTGGATCCTTACAAATTAAGTTTAGTTCCATAG
<i>Cb-aldh</i>	161	Gevo-318	54	TCCATAGTCGACATGAATAAAGACACACTAATACCT
		Gevo-249	55	AATTGGATCCTTAGCCGGAAGTACACATCTTCTTGTCT
<i>Ca-thl</i>	162	Gevo-308	56	GATCGAGTCGACATGAAAGAAGTTGTAATAGCTAG
		Gevo-309	57	GTTATAGGATCCCTAGCACTTTTCTAGCAATATTG
<i>Ca-hbd</i>	163	Gevo-281	58	GTGGATGTCGACATGAAAAAGGTATGTGTTATAGGTG
		Gevo-161	59	AATTGGATCCTTATTTTGAATAATCGTAGAAACCT
<i>Ca-crt</i>	164	Gevo-282	60	TCCTACGTCGACATGGAATAAACAATGTCATCCT
		Gevo-283	61	TAACCTGGATCCCTATCTATTTTTGAAGCCTTCAAT
<i>Ca-bcd</i>	165	Gevo-284	62	CAAGAGGTCGACATGGATTTTAATTTAACAAGAGAAC
		Gevo-285	63	CAATAAGGATCCTTATCTAAAAATTTTCTGAAATAAC
<i>Ca-ettA</i>	166	Gevo-286	64	CGGGAAGTCGACATGAATAAAGCAGATTACAAGGGC
		Gevo-287	65	GTTCAAGGATCCTTAATTATTAGCAGCTTTAACTTG
<i>Ca-ettB</i>	167	Gevo-288	66	CAAAATTGTCGACATGAATATAGTTGTTTGTAAAAAC
		Gevo-289	67	GTTTTAGGATCCTTAAATATAGTGTCTTCTTTAATTTT

Gene	Gene SEQ ID NO:	Nome do Primer	SEQ ID NO:	Sequência Primer
				G
Ca- adhE2	168	Gevo-292	68	CAAGAAGTCGACATGAAAGTTACAAATCAAAAAGAAC
		Gevo-293	69	TCCTATGCGGCCGCTTAAATGATTTTATATAGATATCC
Ca-aad	169	Gevo-290	70	AGGAAAGTCGACATGAAAGTCACAACAGTAAAGGA
		Gevo-291	71	ATTTAAGCGGCCGCTTAAGGTTGTTTTTAAACAATTT
Ca- bdhA	170	Gevo-294	72	CATAACGTCGACATGCTAAGTTTTGATTATTCAATAC
		Gevo-247	73	AATTGGATCCTTAATAAGATTTTTTAAATATCTCAA
Ca- bdhB	171	Gevo-295	74	CATAACGTCGACATGGTTGATTTTGAATATTCAATAC
		Gevo-159	75	AATTGGATCCTTACACAGATTTTTTGAATATTTGTA
Ca-thl- co	1	Gevo-310	76	GATCGAGAATTCATGAAAGAAGTTGTAATAGCTAG
		Gevo-309	77	GTTATAGGATCCCTAGCACTTTTCTAGCAATATTG
Ca-hbd- co	2	Gevo-296	78	CGGATAGTCGACATGAAAAAGGTATGTGTTATAGGC
		Gevo-297	79	TCCCAAGGATCCTTATTTTGAATAATCGTAGAAACCCT
Ca-crt- co	3	Gevo-282	80	TCCTACGTCGACATGGAATAACAATGTCATCCT
		Gevo-283	81	TAACTTGGATCCCTATCTATTTTTGAAGCCTTCAAT
Ca-bcd- co	4	Gevo-284	82	CAAGAGGTCGACATGGATTTTAATTTAACAAGAGAAC
		Gevo-298	83	GTAAAGGGATCCTTAACTAAAAATTTTTCTGAAATG
Ca-eflA- co	5	Gevo-286	84	CGGGAAGTCGACATGAATAAAGCAGATTACAAGGGC
		Gevo-299	85	GTTCAAGGATCCTTAATTATTAGCAGCTTTAACCTG
Ca-eflB- co	6	Gevo-288	86	CAAAATTGTCGACATGAATATAGTTGTTTGTTTAAAC
		Gevo-300	87	GACTTTGGATCCTTAAATATAGTGTTCTTCTTTGAG
Ca- adhE2- co	7	Gevo-292	88	CAAGAAGTCGACATGAAAGTTACAAATCAAAAAGAAC
		Gevo-301	89	ATTTTCGGATCCTTAAATGATTTTATATAGATATCTTTT
Me-bcd- co	8	Gevo-302	90	CTTATAGTCGACATGGATTTTAACCTAACAGATATTC
		Gevo-303	91	CCGCCAGGATCCTTAACGTAACAGAGCACCGCCGGT
Me-eflA- co	9	Gevo-304	92	CGGAAAGTCGACATGGATTTAGCAGAATACAAAGGC
		Gevo-305	93	CTTTGTGGATCCTTATGCAATGCCTTTCTGTTTC
Me-eflB- co	10	Gevo-306	94	CAAACCTGAATTCATGGAAATATTGGTATGTGTCAAAC
		Gevo-307	95	ACCAACGGATCCTTAAATGATTTTCTGGGCAACCA
ERG10	154	Gevo-273	96	GTTACAGTCGACATGTCTCAGAACGTTTACATTG
		Gevo-274	97	GATAACGGATCCTCATATCTTTTCAATGACAATAG
lpdA	20	Gevo-610	119	ttttGTCGACACTAGTatgagtactgaaatcaaaactcaggtcgtg
		Gevo-611	120	ttttCTCGAGttacttcttctcgcttcgggttcgg

Gene	Gene SEQ ID NO:	Nome do Primer	SEQ ID NO:	Sequência Primer
<i>aceE</i>	21	Gevo-606	116	tttGTCGACACTAGTatgtcagaacgtttcccaaatgacgtgg
		Gevo-607	117	tttCTCGAGttacgccagacgcgggttaactttatctg
<i>aceF</i>	22	Gevo-653	136	tttGTCGACACTAGTatggctatcgaaatcaaagtaccggacatcggg
		Gevo-609	118	tttCTCGAGttacatcaccagacggcggaatgtcagacag
<i>PDA1</i>	23	Gevo-660	143	tttCTCGAGactagtATGgcaactttaaaaacaactgataagaagg
		Gevo-661	144	tttagatctTTAATCCCTAGAGGCCAAAACCTTGC
<i>PDB1</i>	24	Gevo-662	145	tttCTCGAGactagtATGgcggaagaattggaccgtgatgatg
		Gevo-663	146	tttGGATCCTTATTCAATTGACAAGACTTCTTTGACAG
<i>PDX1</i>	25	Gevo-664	147	TttCTCGAGactagtATGttactgtctgtaagacatttcaatgcc
		Gevo-665	148	tttggatccTCAAAATGATTCTAACTCCCTTACGTAATC
<i>LAT1</i>	26	Gevo-656	139	tttCTCGAGgctagcATGGCATCGTACCCAGAGCACACCAT
		Gevo-657	140	tttGGATCCTCACAAATAGCATTTCCAAAGGATTTTCAAT
<i>LPD1</i>	27	Gevo-658	141	tttCTCGAGactagtATGGTCATCATCGGTGGTGGCCCTGC
		Gevo-659	142	tttGGATCCTCAACAATGAATAGCTTTATCATAGG
<i>PDC1</i>	28	Gevo-639	129	tttctcgagactagtATGTCTGAAATTACTTTGGG
		Gevo-640	130	tttggatccTTATTGCTTAGCGTTGGTAGCAGCAG
<i>CUP1 prom</i>	178	Gevo-637	127	tttGAGCTCgccgatcccattaccgacatttggg
		Gevo-638	128	aaaGTCGACaccgatatacctgtatgtgcaccaccaatgtatctataagtatc catGCTAGCCCTAGGtttatgtgatgattgattgattg
<i>pflA</i>	36	PflA forw	98	cattgaattcatgtcagttattgggtcgattcac
		PflA Rev	99	cattgtcgacttagaacattacattatgaccgtactg
<i>pflB</i>	37	PflB forw	100	cattgaattcatgtccgagcttaataaaaagtttagcc
		PflB Rev	101	cattgtcgacttacatagattgagtggaaggtacgag
<i>Cb- FDH1</i>	38	fdh1_forw	102	cattgaattcatgaagatcggttttagtcttatatgggtgc
		fdh1_rev	103	cattgtcgacttattcttatcggtttaccgtaagc
<i>KIALD6</i>	39	KIALD6_rig ht3	104	gttaggatccttaataccaactgactgacggccttg
		KIALD6_Lef t5	105	ccaagtcgacatgtcctctacaattgctgagaaattgaacctc
<i>KIACS1</i>	40	KIACS1_Ri ght3	106	gttagcgccgcttataattcacggaatcgatcaagtg
		KIACS1_Lef t5	107	ccaagctagcatgtctctgctgttgataccgcttc
<i>KIACS2</i>	41	KIACS2_rig ht3	108	gggtggatccttattctctgctgactgaaaaattgatttctactgc
		KIACS2_Lef t5	109	ccaagaattcatgtcgtcgataaattgcataagg
<i>ACS1</i>	30	Gevo-479	112	catgccgtcgacatgtcgccctctgccgtac
		Gevo-480	113	gattaagcggccgcttacaactgaccgaatcaattag
<i>ACS2</i>	31	Gevo-483	114	gatgaagtcgacatgacaatcaaggaacataaagtag
		Gevo-484	115	gttaaaggatccttattcttttttgagagaaaaattg
<i>ALD6</i>	29	Gevo-643	133	ccaagtcgacatgactaagctacacttgacac
		Gevo-644	134	gtcggtaagagtgttgcgtggactcg
<i>Ca-ter</i>	179	Gevo-345	183	atgtttgtcgacatgatagtaaaagcaaagtgtga
		Gevo-346	184	cttaatgcggccgcttaagggtctaatttcttaataattc
<i>Ah-ter</i>	180	Gevo-343	185	Gcttgagtcgacatgatcattaaaccgaaagttcg

Gene	Gene SEQ ID NO:	Nome do Primer	SEQ ID NO:	Sequência Primer
<i>Eg-ter</i>	181	Gevo-344	186	atttaaggatcctcacagttcgacaacatcaaattta
		Gevo-347	187	catcacgtcgacatggccatgttcaccactac
<i>Sc-ccr</i>	182	Gevo-348	188	ctcgcgggatccttactgctgagctgcgctc
		Gevo-341	189	gtcttagtcgacatgaccgtgaaagacattctg
		Gevo-342	190	attggcggatcctcacacattacggaaacggta

A tabela 2 lista um conjunto de construtos de plasmídeo e suas características relevantes, como descritos nos exemplos. Incluídos na tabela estão os nomes dos plasmídeos relevantes (pGV); o atual marcador prototrófico, útil para seleção e manutenção do plasmídeo em uma espécie auxotrófica; uma sequência promotora (a partir da região dada do gene *S. cerevisiae*); o gene sob controle do promotor acima-mencionado; combinações promotor + gene; se presente.

Tabela 2: Sumário de características relevantes de plasmídeos nos Exemplos.

Nome	Marcador prototrófico	Promotor 1	GENE 1	Promotor 2	GENE 2
pGV1099	<i>HIS3</i>	TEF1	(AU1 tag)		
pGV1100	<i>TRP1</i>	TEF1	(HA tag)		
pGV1101	<i>LEU2</i>	TEF1	(AU1 tag)		
pGV1102	<i>URA3</i>	TEF1	(HA tag)		
pGV1103	<i>HIS3</i>	TDH3	(myc tag)		
pGV1104	<i>TRP1</i>	TDH3	(myc tag)		
pGV1105	<i>LEU2</i>	TDH3	(myc tag)		
pGV1106	<i>URA3</i>	TDH3	(myc tag)		
pGV1208	<i>TRP1</i>	TEF1	Ca-hbd-co		
pGV1209	<i>LEU2</i>	TEF1	Ca-crt-co		
pGV1213	<i>URA3</i>	TEF1	Ca-adhE2-co		
pGV1214	<i>HIS3</i>	TDH3	Me-bcd-co		
pGV1217	<i>TRP1</i>	TEF1	Ca-hbd-co	TDH3	Ca-eftA-co
pGV1218	<i>LEU2</i>	TEF1	Ca-crt-co	TDH3	Ca-eftB-co
pGV1219	<i>HIS3</i>	TEF1	ScERG10	TDH3	Me-bcd-co
pGV1220	<i>HIS3</i>	TEF1	Ca-thl-co	TDH3	Ca-bcd-co
pGV1221	<i>TRP1</i>	TEF1	Ca-hbd-co	TDH3	Me-eftA-co
pGV1222	<i>LEU2</i>	TEF1	Ca-crt-co	TDH3	Me-eftB-co
pGV1223	<i>HIS3</i>	TEF1	ScERG10	TDH3	Ca-bcd-co
pGV1224	<i>HIS3</i>	TEF1	Ca-thl-co	TDH3	Me-bcd-co
pGV1225	<i>HIS3</i>	TEF1	Ca-thl-co	TDH3	Ca-ter
pGV1226	<i>HIS3</i>	TEF1	Ca-thl-co	TDH3	Ah-ter

Nome	Marcador prototrófico	Promotor 1	GENE 1	Promotor 2	GENE 2
pGV1227	<i>HIS3</i>	TEF1	Ca-thl-co	TDH3	Eg-ter
pGV1228	<i>HIS3</i>	TEF1	Ca-thl-co	TDH3	Sc-ccr
pGV1262	<i>LEU2</i>	TEF1	ScACS1		
pGV1263	<i>URA3</i>	TEF1	ScACS2		
pGV1319	<i>URA3</i>	TDH3	Ca-AdhE2_co	TEF1	ACS1
pGV1320	<i>URA3</i>	TDH3	Ca-AdhE2_co	TEF1	ACS2
pGV1321	<i>LEU2</i>	TDH3	<i>ALD6</i>		
pGV1326	<i>LEU2</i>	TEF1	<i>ALD6</i>		
pGV1334	<i>HIS3</i>	TDH3	<i>lpdA</i>		
pGV1339	<i>LEU2</i>	TEF1	Ca_Crt_co	TDH3	<i>ALD6</i>
pGV1379	<i>HIS3</i>	TDH3	<i>aceE</i>		
pGV1380	<i>HIS3</i>	TDH3	<i>aceF</i>		
pGV1381	<i>HIS3</i>	TDH3	<i>LAT1</i>		
pGV1383	<i>HIS3</i>	TDH3	<i>PDA1</i>		
pGV1384	<i>HIS3</i>	TDH3	<i>PDB1</i>		
pGV1385	<i>HIS3</i>	TDH3	<i>PDX1</i>		
pGV1388	<i>URA3</i>	CUP1	n/a		
pGV1389	<i>URA3</i>	TDH3	<i>PDC1</i>		
pGV1399	<i>LEU2</i>	TEF1	Ca-hbd-co	TDH3	<i>ALD6</i>
pGV1414	<i>URA3</i>	MET3	n/a		
pGV1428	<i>HIS3</i>	TDH3	n/a		
pGV1429	<i>TRP1</i>	TDH3	n/a		
pGV1430	<i>LEU2</i>	TDH3	n/a		
pGV1483	<i>URA3</i>	MET3	n/a		
pGV1603	<i>TRP1</i>	TDH3	<i>aceE</i>		
pGV1604	<i>LEU2</i>	TDH3	<i>aceF</i>		
pGV1605	<i>URA3</i>	TEF1	<i>adhE2</i>	TDH3	<i>PDC1</i>
1102Fdhl	<i>URA3</i>	TEF1	<i>Cb-FDH1</i>		
1103PflA	<i>HIS3</i>	TDH3	<i>pflA</i>		
1104PflB	<i>TRP1</i>	TDH3	<i>pflB</i>		
1208_PflA	<i>TRP1</i>	TEF1	Ca_hbd_co	TDH3	pflA
1208KI	<i>HIS3</i>	TEF1	Ca_hbd_co		
1208KIALD6	<i>HIS3</i>	TEF1	Ca_hbd_co	TDH3	<i>KIALD6</i>
1208KIPflA	<i>HIS3</i>	TEF1	Ca_hbd_co	TDH3	pflA
1208KIPflA	<i>TRP1</i>	TEF1	Ca_Crt_co	TDH3	pflB
1208-lpdA	<i>TRP1</i>	TEF1	thl	TDH3	-lpdA
1209_PflB	<i>LEU2</i>	TEF1	Ca_Crt_co	TDH3	<i>pflB</i>
1209-aceE	<i>LEU2</i>	TEF1	crt	TDH3	aceE
1209KI	<i>TRP1</i>	TEF1	Ca_Crt_co		

Nome	Marcador prototrófico	Promotor 1	GENE 1	Promotor 2	GENE 2
1209KIACS1	LEU2	TEF1	Ca_Crt_co	TDH3	KIACS1
1209KIACS2	LEU2	TEF1	Ca_Crt_co	TDH3	KIACS2
1213_Fdh1	URA3	TDH3	Ca_AdhE2_co	TEF1	Cb-FDH1
1213-aceF	URA3	TEF1	adhE2	TDH3	aceF
1213KI	URA3	TDH3	Ca_AdhE2_co		
1213KIPfIA	LEU2	TEF1	Ca_thl_co	TDH3	Cb-FDH1
1227KI	LEU2	TEF1	Ca_thl_co	TDH3	Eg-TER-co
1388-PDC1	URA3	CUP1	PDC1		
1428_PfIA	HIS3	TDH3	pflA		
1428ALD6	HIS3	TDH3	KIALD6		
1428-lpdA	HIS3	TDH3	lpdA		
1429_PfIB	TRP1	TDH3	pflB		
1429-aceE	TRP1	TDH3	aceE		
1429ACS1	TRP1	TDH3	KIACS1		
1430_Fdh1	LEU2	TDH3	Cb-FDH1		
1430-aceF	LEU2	TDH3	aceF		
1431ACS2	URA3	TDH3	KIACS2		
pGV1103-lpd1	HIS3	TDH3	LPD1		

A tabela 3 descreve o butanol produzido em uma levedura *S. cerevisiae* (espécie W303a) conduzindo vários plasmídeos, pelo presente expressando um conjunto de genes introduzidos, que estão listados.

5 Tabela 3: Produção de butanol por através de *Saccharomyces cerevisiae* transformantes.

Nome Isolado	Combinação de plasmídeo	Genes Introduzidos	Quantidade de Butanol 72 hpi (µM)
Gevo 1094; Gevo1095	pGV1208; pGV1209; pGV1225; pGV1213	<i>Ca-hbd-co; Ca-Crt-co; Ca-thl-co+Ca-ter; Ca-adhE2-co</i>	129; 145
Gevo 1096; Gevo1097	pGV1208; pGV1209; pGV1226; pGV1213	<i>Ca-hbd; Ca-Crt; Ca-thl-co+Ah-ter; Ca-adhE2-co</i>	207; 216
Gevo 1098; Gevo1099	pGV1208; pGV1209; pGV1227; pGV1213	<i>Ca-hbd; Ca-Crt; Ca-thl-co+Eg-ter; Ca-adhE2-co</i>	251; 313
Gevo 1100, Gevo1101	pGV1208; pGV1209;	<i>Ca-hbd; Ca-Crt; Ca-thl-co+Sc-ter; Ca-adhE2-</i>	109; 109

Nome isolado	Combinação de plasmídeo	Genes Introduzidos	Quantidade de Butanol 72 hpi (µM)
	pGV1228; pGV1213	co	
Gevo 1102, Gevo1103	pGV1217; pGV1218; pGV1220; pGV1213	<i>Ca-hbd-co</i> + <i>Ca-etfa-co</i> ; <i>Ca-Crt-co</i> + <i>Ca-etfb-co</i> ; <i>Ca-thl-co</i> + <i>Ca-bcd-co</i> ; <i>Ca-adhE2-co</i>	317; 332
Gevo 1104, Gevo1105	pGV1217; pGV1218; pGV1223; pGV1213	<i>Ca-hbd-co</i> + <i>Ca-etfa-co</i> ; <i>Ca-Crt-co</i> + <i>Ca-etfb-co</i> ; <i>ERG10</i> + <i>Ca-bcd-co</i> ; <i>Ca-adhE2-co</i>	172; 269
Gevo 1106, Gevo1107	pGV1221; pGV1222; pGV1224; pGV1213	<i>Ca-hbd-co</i> + <i>Ca-etfa-co</i> ; <i>Ca-Crt-co</i> + <i>Ca-etfb-co</i> ; <i>Ca-thl-co</i> + <i>Me-bcd-co</i> ; <i>Ca-adhE2-co</i>	125; 115
Gevo 1108, Gevo1109	pGV1221; pGV1222; pGV1219; pGV1213	<i>Ca-hbd-co</i> + <i>Ca-etfa-co</i> ; <i>Ca-Crt-co</i> + <i>Ca-etfb-co</i> ; <i>ERG10</i> + <i>Me-bcd-co</i> ; <i>Ca-adhE2-co</i>	101; 124
Gevo 1110, Gevo1111	pGV1099; pGV1100; pGV1101; pGV1106	N/A	0; 12

Todos os procedimentos de clonagem e combinação de gene foram inicialmente realizados em *E. coli* utilizando métodos estabelecidos (Miller, JH, 1992, Sambrook, J. et. Al, 2001).

Um conjunto de vetores útil para a expressão em uma levedura, *S. cerevisiae*, foi descrito anteriormente (Mumberg, D., et al. (1995) Gene 156:119-122; Sikorski & Heiter (1989) Genetics 122: 19-27). Em particular, essas publicações descrevem um conjunto de marcadores selecionáveis (*HIS3*, *LEU2*, *TRPI*, *URA3*) e replicação de origens *S. cerevisiae* que também são usadas em muitos dos vetores listados na Tabela 2.

Exemplo 1. Construção de Plasmídeo para expressão de genes do percurso de butanol na levedura *S. cerevisiae*.

O gene *S. cerevisiae* tiolase, *ERG10*, foi clonado por PCR de DNA genômico da espécie *S. cerevisiae* W303a, utilizando primers que introduziram um *Sal* \ local imediatamente a montante do códon de partida e um *BamH* \ local imediatamente após o códon parar. Este produto da PCR foi digerido com *Sal* / e *BamH* \ e clonado no mesmo em locais de pUC19 (Yanisch-Perron, C, Vieira, J., 1985, Gene, 33, 103-19) para gerar pGV1120.

Os plasmídeos pGV1031, pGV1037, pGV1094, e pGV1095 foram utilizados como modelos para amplificação de PCR do gene *C. acetobutylicum* (*Ca*)-*Ca-THL*, *Ca-hbd*, *Ca-crt*, e *Ca-bdhB*, respectivamente. pGV1090 foi utilizado como modelo para a amplificação de PCR de *Ca-bcd*, *Ca-etfA*, e *Ca-etfB*. O DNA genômico de *Clostridium* ATCC 824 foi utilizado para amplificar *Ca-bdhA*. Fragmentos amplificados foram digeridos com *Sal* / e *BamH* \ e clonado no mesmo local de pUC19. Estes esquemas de plasmídeos gerados, pGV1121,

pGV1122, pGV1123, pGV1124, pGV1125, pGV1126, pGV1127, pGV1128, que contêm os genes, *Ca-thl*, *Ca-hbd*, *Ca-crt*, *Ca-bcd*, *Ca-ettA*, *Ca-ettB*, *Ca-bdhA*, e *Ca-bdhB*, respectivamente.

O gene *Clostridium beijerinckii* (Cb), *Cb-hbd*, *Cb-crt*, *Cb-bcd*, *Cb-ettA*, *Cb-ettB*, *Cb-aldh* e *Cb-Adha* foram amplificados por PCR utilizando primers projetados para introduzir um *SalI* local apenas a montante do início e uma *BamHI* local apenas a jusante do códon parar. Os plasmídeos pGV1050, pGV1049, pGV1096 e pGV1091 foram utilizados como modelos para a amplificação de PCR de *Cb-hbd*, *Cb-crt*, *Cb-aldh*, e *Cb-Adha*, respectivamente. O DNA genômico de *Clostridium beijerinckii* ATCC 51743 foi utilizado como modelo para *Cb-bcd*, *Cb-ettA* e *Cb-ettB*. Os fragmentos PCR amplificados foram digeridos com *SalI* e *BamHI* e clonados nos mesmos locais de pUC19. Este procedimento gerou plasmídeos pGV1129, pGV1130, pGV1131, pGV1132, pGV1133, pGV1134, e pGV1135, que contêm os genes *Cb-hbd*, *Cb-crt*, *Cb-bcd*, *Cb-ettA*, *Cb-ettB*, *Cb-aldh*, e *Cb-Adha*, respectivamente.

Os genes *C. acetobutylicum* e *Meghasphaera elsdenii* (Me)-genes que foram otimizados pelo códon (co-) para a expressão em *E. coli* também foram clonados. Estes genes incluem *Ca-thl-co*, *Ca-hbd-co*, *Ca-crt-co*, *Ca-bcd-co*, *Ca-ettA-co*, *Ca-ettB-co*, *Ca-adhE2-co*, *co-Me-bcd*, *Me-ettA-co*, e *Me-ettB-co*. Estes genes, exceto para o *Ca-thl-co* e *co-Me-ettB* foram amplificados utilizando primers destinados a introduzir um *SalI* local apenas a montante do códon de partida e um *BamHI* local apenas a jusante do códon de parada. No caso do *Ca-THL-Me-ettB* e *co-co*, primers foram designados para introduzir um local *EcoRI* apenas a montante do códon de partida e um *BamHI* local apenas a jusante do códon de parada. Os produtos resultantes da PCR foram digeridos utilizando as enzimas restrição apropriadas (*SalI* e *BamHI* ou *EcoRI* e *BamHI*) e clonados no mesmo local de pUC19 para gerar plasmídeos pGV1197, pGV1198, pGV1199, pGV1200, pGV1201, pGV1202, pGV1203, pGV1205, pGV1206, que contêm os genes, *Ca-thl-co*, *Ca-hbd-co*, *Ca-crt-co*, *Ca-bcd-co*, *Ca-ettA-co*, *Ca-ettB-co*, *Ca-adhE2-co*, *Me-ettA-co*, e *co-Me-ettB*, respectivamente. O gene *Me-bcd-co* foi clonado em pGV1103 diretamente como um fragmento *SalI-BamHI* para gerar pGV1214.

Os genes acima foram clonados em vetores de expressão alta cópia de levedura, pGV1099, pGV1100, pGV1101, pGV1102, pGV1103, pGV1104, pGV1105 e pGV1106. As propriedades dos vetores utilizados para a clonagem de gene e construtos de plasmídeos resultantes são descritos na Tabela 2.

Os genes tiolase, *ERG10* e *Ca-thl* foram liberados a partir de pGV1120 e pGV1121 utilizando *SalI* e *BamHI* e clonados em pGV1099 (transportando um marcador *HIS3*) para gerar pGV1138 e pGV1139, respectivamente. O gene tiolase otimizado pelo códon, *Ca-thl-co* foi removido de pGV1197 e clonado em pGV1099 utilizando *EcoRI* e *BamHI* para gerar pGV1207. Assim, estes genes são clonados em moldura (in-frame) com duas cópias da etiqueta AU1 (SEQ ID NO: 172) e expresso utilizando a região promotora do *S. cerevisiae*

TEF1 (SEQ ID NO: 175). O gene hidroxibutiril-CoA-desidrogenase, *Ca-hbd* (de pGV1122), *Cb-hbd* (de pGV1129) e *Ca-hbd-co* (de pGV1198) foram clonados em pGV1100 (conduz o marcador *LEU2*), utilizando *Sal I* e *SamHI* para gerar pGV1140, pGV1141, e pGV1208, respectivamente. Isso resulta em sendo estes genes clonados em moldura com uma etiqueta HA (SEQ ID NO: 173) e expressa utilizando o promotor *TEF1*. O gene crotonase, *Ca-crt* (de pGV1123), *Cb-crt* (de pGV1130), *Ca-crt-co* (de pGV1199) foram clonados em pGV1101 (conduz o marcador *TRP1*), utilizando *Sal I* e *BamHI* para gerar pGV1142, pGV1143, e pGV1209, respectivamente. Assim, estes genes são clonados em moldura com duas cópias da etiqueta AU1 e expressados utilizando os promotores *TEF1*.

A butiril-CoA desidrogenase e os respectivos genes de transferência de elétrons *etfA* e *etfB* foram clonados por trás de uma etiqueta myc (SEQ ID NO: 174) expressa utilizando a região promotora *TDH3* de *S. cerevisiae* (SEQ ID NO: 176). Os genes *Ca-bcd* (de pGV1124), *Cb-bcd* (de pGV1131), *Ca-bcd-co* (de pGV1200) e *Me-bcd-co* foram clonados em pGV1103 (conduz o marcador *HIS3*) para gerar pGV1144, pGV1145, pGV1210, e pGV1214. Os genes *Ca-etfA* (de pGV1125), *Ca-etfB* (de pGV1126), *Cb-etfA* (de pGV1132), *Cb-etfB* (de pGV1133), *Ca-etfB-co* (de pGV1202) e *Me-etfA-co* (a partir de pGV1205) foram clonados em pGV1104 (conduz o marcador *LEU2*) para gerar pGV1146, pGV1147, pGV1148, pGV1149, pGV1212, e pGV1215, respectivamente. O *Ca-etfA-co* (de pGV1201) e *Me-etfB-co* (de pGV1206) foram clonados em pGV1104 (conduz o marcador *TRP1*) para gerar pGV1211 e pGV1216, respectivamente.

O gene para um aldeído desidrogenase, *Cb-aldh* (de pGV1134), foi clonado em pGV1102 (conduz o marcador *URA3*) para gerar pGV1150. O gene *Cb-aldh* é colocado na moldura com a etiqueta HA (SEQ ID NO: 173) expressa utilizando o promotor *TEF1*. O aldeído / álcool desidrogenases bi-funcional, *Ca-aad*, *Ca-adhE2*, e *Ca-adhE2-co*, e os alcoóis desidrogenases específicos, *Ca-bdhA*, *Ca-bdhB*, e *Cb-Adha* foram clonados por trás de uma etiqueta myc expressado sob o controle do promotor *TDH3*. *Ca-aad* e *Ca-adhE2* foram amplificados por PCR utilizando primers designados a introduzir um *Sal I* local apenas a montante do códon de partida e um *Not I* local apenas a jusante do códon de parada. O plasmídeo, pGV1089, foi utilizado como um modelo para o *Ca-DAA*, e do *C. acetobutylicum* DNA genômico foi usado como um modelo para o *Ca-adhE2*. Estes produtos PCR foram clonados em pGV1106 (conduz o marcador *URA3*), utilizando *Sal I* e *Not I* para gerar pGV1136 (*Ca-daa*) e pGV1137 (*Ca-adhE2*). O códon otimizado *Ca-adhE2-co* (de pGV1203) foi clonado em pGV1106 utilizando *Sal I* e *BamHI* para gerar pGV1213. O álcool desidrogenases, *Ca-bdhA* (de pGV1127), *Ca-bdhB* (de pGV1128) e *Cb-Adha* (a partir de pGV1135), foram clonados em pGV1106 usando *Sal I* e *BamHI* para gerar pGV1151, pGV1152, e pGV1153, respectivamente.

Portanto, os genes de expressão de levedura acima descritos para butiril-CoA desi-

drogenase, a transferência de elétrons da proteína A, a transferência de elétrons da proteína B, e o álcool desidrogenase específico, foram combinadas com o promotor *TEF1* conduzindo tiolase, hidroxibutiril-CoA desidrogenase, crotonase, ou o aldeído desidrogenase, na forma por pares como resumidos na Tabela 2 acima.

5 Para este efeito, os fragmentos EcolCRI para Xho\ de pGV1144 (promotor *TDH3* e *Ca-bcd*) e de pGV1145 (promotor *TDH3* e *Cb-bcd*) foram clonados no *Not* \ (preenchido com Klenow) para Xho \ local de pGV1138 para gerar pGV1167 (*ERG10* + *Ca-bcd*) e pGV1168 (*ERG10* + *Cb-bcd*), respectivamente. Estes mesmos fragmentos EcolCRI para Xho \ foram também clonados similarmente em pGV1139 para gerar pGV1169 (*Ca-thl* + *Ca-bcd*) e
10 pGV1170 (*Ca-thl* + *Cb-bcd*), respectivamente. Utilizando a mesma estratégia, a EcolCRI para fragmentos Xho \ de pGV1146 (promotor *TDH3* e *Ca-ettA*), pGV1148 (promotor *TDH3* e *Ca-ettB*), pGV1147 (promotor *TDH3* e *Cb-ettA*), e pGV1149 (promotor *TDH3* e *Cb-ettB*) foram clonados em *Not* \ (preenchido com Klenow) para Xho \ local de pGV1140, pGV1141, pGV1142, pGV1143 para gerar pGV1171 (*Ca-hbd* + *Ca-ettA*), pGV1172 (*Ca-crt* + *Ca-ettB*),
15 pGV1173 (*Cb-hbd* + *Cb-ettA*), e pGV1174 (*Cb-crt* + *CB-ettB*), respectivamente. O aldeído desidrogenases e o álcool desidrogenase foram combinados de modo similar clonando a EcolCRI para fragmentos Xho\ de pGV1151 (promotor *TDH3* e *Ca-bdhA*), pGV1152 (promotor *TDH3* e *Ca-bdhB*) e pGV1153 (promotor *TDH3* e *Cb-Adha*) na (preenchido com Klenow) para Xho\ local de pGV1150 para gerar pGV1175 (*Cb-aldh* + *Ca-bdhA*), pGV1176 (*Cb-aldh*
20 + *Ca-bdhB*), e pGV1177 (*Cb-aldh* + *Cb-Adha*), respectivamente.

No caso de genes otimizada por códon, o EcolCRI para fragmentos Xho\ de pGV1210 (promotor *TDH3* e *Ca-bcd-co*), pGV1211 (promotor *TDH3* e *Ca-ettA-co*), pGV1212 (Promotor *TDH3* e *Ca -ettB-co*) foram clonados na *BamH* \ (preenchido com Klenow) para Xho \ local de pGV1207, pGV1208, e pGV1209, respectivamente, para gerar pGV1220 (*Ca-thl-co-Ca* + *bcd-co*), pGV1217 (*Ca -Ca* + *hbd-co-co-ettA*), e pGV1218 (*Ca-crt-co* + *Ca-ettB-co*). O EcolCRI para fragmentos Xho \ de pGV1214 (Promotor *TDH3* e *Me-bcd-co*), pGV1215 (Promotor *TDH3* e *Me-ettA-co*), pGV1216 (Promotor *TDH3* e *co-Me-ettB*) também foram clonados para o mesmo conjunto de vetores, respectivamente, para gerar pGV1224 (*Ca-thl-co* + *Me-bcd-co*), pGV1221 (*Ca-hbd-co-* + *Me-ettA-co*), e pGV1222 (*Ca-crt-co* + *Me-ettB-co*). Além disso, o EcolCRI para fragmentos Xho\ de pGV1210 (Promotor *TDH3* e *Ca-bcd-co*) e de pGV1214 (Promotor *TDH3* e *Me-bcd-co*) foram clonados na *BamHI* (preenchido com Klenow) para Xho \ local de pGV1138 para gerar pGV1223 (*ERG10* + *Ca-bcd-co*) e pGV1219 (*ERG10* + *Me-bcd-co*).

35 Além dos referidos percursos, constructos foram gerados que utilizam alternativas ao complexo *bcdletfA* / *ettB*, a saber, trans-enoil redutase e crotonil-CoA redutase. Genes trans-enoil redutase de *C. aetobutylicum* (*Ca-ter*), *Aeromonas hydrophila* (*Ah-ter*), e *Euglena gracilis* (*Eg-ter*) e o crotonil-CoA redutase de *Streptomyces collinus* (*SC-ccr*) foram clonados.

Ca-ter foi amplificados por PCR a partir do DNA genômico de *C. acetobutylicum* utilizando primers designados para introduzir um *Sa*/ \ local imediatamente a montante do códon de partida e um *Not* \ local apenas a jusante do códon de parada. *Ah-ter*, *Eg-ter*, e *SC-ccr* foram amplificados por PCR a partir de pGV1114, pGV1115, e pGV1166, respectivamente, utilizando primers designados para introduzir um *Sa*/ \ local imediatamente a montante do códon de partida um *Bam*HI \ local apenas a jusante do códon de parada. As sequências para estes três genes foram otimizadas pelo códon para expressão em *E. coli*. Também, a sequência *Eg-ter* codifica para uma proteína que está faltando à região N-terminal, que podem estar envolvidos na localização mitocondrial. Os respectivos produtos PCR foram clonados em pGV1103 utilizando enzimas de restrição adequadas para gerar pGV1155 (*Ca-ter*), pGV1156 (*Ah-ter*), pGV1157 (*Eg-ter*) e pGV1158 (*SC-ccr*).

Para o uso em expressar o percurso de butanol em levedura, estas alternativas para o complexos *bcd* / *etfA* / *etfB* foram cada um combinado com um gene tiolase em um plasmídeo. Os genes *Ca-ter*, *Ah-ter*, *Eg-ter* e *Sc-ccr* foram combinados com o gene *Ca-thl-co* clonando a *Eco*LCRI para fragmento *Xho* \ de pGV1155, pGV1156, pGV1157 e pGV1158 em *Bam*HI (preenchido com Klenow) para *Xho* \ local de pGV1207 para gerar pGV1225 (*Ca-thl-co* + *Ca-ter*), pGV1226 (*Ca-thl-co* + *Ah-ter*), pGV1227 (*Ca-thl-co* + *Eg-ter*) e pGV1228 (*Ca-thl-co* + *SC-ccr*), respectivamente.

Exemplo 2. Extrato de Levedura / Análise Ocidental do Borrão

Para a análise da expressão protéica, os extratos brutos da proteína da levedura foram feitos por um rápido protocolo de precipitação TCA. Um equivalente OD600 de células foram coletados e tratados com 200 μ L de NaOH/7.4% 2-mercaptoetanol 1,85N no gelo durante 10 min. 200 μ L de TCA 50% foi adicionado e as amostras incubadas em gelo por um acréscimo de 10 min. As proteínas precipitadas foram coletadas por centrifugação a 25.000 rcf durante 2 minutos e lavados com 1 mL de acetona em gelo frio. As proteínas foram novamente coletadas por centrifugação a 25,000 rcf por 2 min. O pellet foi então ressuspenso em amostra tampão de SDS e fervida (99° C) por 10 min. As amostras foram centrifugadas a um máximo em uma microcentrífuga por 30 segundos para remover matéria insolúvel.

Amostras foram separadas por SDS-PAGE e transferidas para nitrocelulose. Foi feita a análise ocidental utilizando o TMB Western Blot Kit (KPL). Anticorpos HA.11, myc (9E10), e AU1 foram obtidos a partir de Covance. Os ocidentais foram desempenhados conforme descrito pelo fabricante, exceto que quando o anticorpo myc foi utilizado, o detector da solução em bloco foi utilizado em 0.3x a 0.5x suplementados com 1% do detector de pó no bloco. A expressão de todos os genes descritos no Exemplo 1, foi verificada utilizando este método.

Exemplo 3. Transformações em Levedura.

Foram feitas transformações de *Saccharomyces cerevisiae* (W303a) utilizando mé-

todo de acetato de lítio (Gietz, RDaRAW, 2002, *Methods in Enzymology*, 350, 87-96). Resumidamente, 1 mL de uma cultura de levedura tratada durante a noite (overnight) foi diluída em 50 mL de meio fresco YPD e incubados em um agitador a 30° C por 5 a 6 horas. As células foram coletadas, lavadas com 50 mL de água esterilizada, e lavadas com 25 mL de água estéril. As células foram ressuspensas utilizando 1 mL de acetato de lítio 100 mM e transferido para um tubo de microcentrifuga. As células foram peletizadas por centrifugação durante 10 s. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 4x o volume de acetato de lítio 100 mM. 15 μ L de células foram adicionados à mistura de DNA (72 μ L de PEG 50%, 10 μ L de acetato de lítio 1 M, 3 μ L 10mg/mL de DNA desnaturado do es-

perma do salmão, 2 μ L de cada um do DNA do plasmídeo desejado e água estéril a um volume total de 100 μ L). As amostras foram incubadas a 30° C por 30 min e chocado ao calor a 42° C por 22 min. As células foram então coletadas por centrifugação durante 10 s, ressuspensas em 100 μ L em médio SOS (Sambrook, J., Fritsch, EF, Maniatis, T., 1989), e chapeada nas chapas de seleção SC apropriadas (C Kaiser, M., S. Mitchel e A, 1994) - sem uracil, triptofano, leucina ou histidina.

Exemplo 4. Produção de n-butanol.

Transformantes (Tabela 1 acima) expressando diferentes combinações de enzimas relacionadas à proposta do percurso de produção de butanol foram avaliados para produção de n-butanol. Pré-culturas dos isolados foram preparadas pela inoculação de algumas colônias de placas SC ágar em 3 mL de SC médio (C Kaiser, M., S. e Mitchel, A, 1994), que foi agitada sob condições aeróbias durante 16 horas a 30°C a 250 rpm. As células resultantes foram peletizadas a 4000xg por 5 minutos e ressuspensas em 500 μ L de SC médio. O crescimento celular foi avaliado pela absorbância a 600nm com diluições adequadas. Para cada isolado testado, células produzindo 15 OD foram injetadas (200 μ L) em tubos BALCH anaeróbio contendo 5 mL de SC médio anaeróbio, previamente saturada com gás N₂ para remover oxigênio dissolvido. Os tubos foram incubados a 30° C com agitação a 250 rpm para impedir a fixação da célula.

Os tubos foram amostrados 10, 26, 44 e 70 horas após a inoculação através da remoção de 500 μ L da cultura com uma seringa esterilizada. Posteriormente, 250 μ L de 40% em solução glicosada foram injetados em cada tubo para manter o carbono adequado no meio de cultura. Em cada momento, as amostras foram centrifugadas para peletizar as células e o sobrenadante foi imediatamente congelado até que todas as amostras fossem coletadas.

A produção de N-butanol pelo transformantes foi determinada através da análise por cromatografia gasosa (GC). Todas as amostras congeladas foram descongeladas em temperatura ambiente e 400 μ L de cada amostra com 80 μ L de Pentanol 10mM adicionado como um controle interno foi filtrada através de um filtro de 0,2 μ m. 200 μ L do filtrado resul-

tante foi colocado em frascos GC e submetidos à análise GC.

Amostras foram executadas em uma cromatografia gasosa de Série II Plus com um detector de ionização por chama (FID), equipado com um sistema automático HP-7673. Os analitos foram identificados com base em tempos de retenção de padrões autênticos e quantificados utilizando curvas de calibração de ponto 5. Todas as amostras foram injetadas em um volume de $1\mu\text{L}$. A análise direta do produto n-butanol foi realizada em uma coluna capilar DB-FFAP (30 m de comprimento, 0,32 mm ID, espessura da película de $0,25\mu\text{m}$) ligado ao detector FID. O programa de temperatura para separar o produto do álcool foi injetor a 225°C , detector a 225°C , forno a 50°C por 0 minutos, em seguida, gradiente de $8^\circ\text{C}/\text{minuto}$ a 80°C , gradiente de $13^\circ\text{C} / \text{minuto}$ a 170°C , gradiente de $50^\circ\text{C} / \text{minuto}$ a 220°C , então 220°C por 3 minutos.

Para avaliação da produção de butanol, dois independentes transformantes de cada combinação de plasmídeo foram testados. Os resultados são resumidos na Tabela 3 acima. Os dois números Gevo em "Nome Isolado" referem-se aos dois transformantes independentes avaliados para cada combinação do plasmídeo.

A quantidade de butanol produzida ao longo do tempo por dois dos melhores produtores, transformantes Gevo1099 e Gevo1102, relativa ao isolados transformados apenas com os vetores vazios, Gevo1110 e Gevo1111 são mostrados a seguir (Figura 6). Gevo1099 e Gevo1102 exibiram um aumento na produção de butanol ao longo do tempo com concentração crescente do butanol de $123\mu\text{M}$ a $313\mu\text{M}$ e de $57\mu\text{M}$ a $317\mu\text{M}$, respectivamente, de 24 a 72 horas após a inoculação.

Exemplo 5. Clonagem e Expressão de subunidades de *E. coli* de Piruvato Desidrogenase em *Saccharomyces cerevisiae*.

O objetivo deste exemplo é o de descrever como clonar genes *aceE*, *aceF*, e *lpdA* provenientes de *E. coli*, que juntos compreendem as três subunidades da enzima piruvato desidrogenase (PDH), como encontrado em *E. coli*. Os três genes foram amplificados a partir de DNA genômico utilizando PCR. Este exemplo ilustra também a forma como os produtos protéicos destes três genes foram expressos em um organismo hospedeiro, *Saccharomyces cerevisiae*.

O gene *lpdA* proveniente de *E. coli* foi amplificado por PCR utilizando o DNA genômico de *E. coli* como um modelo. Para amplificar especificamente *lpdA*, os primers Gevo-610 e Gevo-611 foram utilizados; outros reagentes PCR foram fornecidos nos kits do fabricante, por exemplo, Kod Hot Start Polimerase (Novagen, Inc., catalog # 71086-5), e utilizados de acordo para o protocolo do fabricante. Os primers diretos e reversos incorporaram nucleotídeos codificando locais de restrição de endonuclease *Sall* e *XhoI* restrição endonuclease sites, respectivamente. O produto PCR resultante digerido com *Sall* e *XhoI* e clonado em pGV1103, rendendo pGV1334. O DNA *lpdA* inserido foi sequenciado na sua totalidade.

Os genes *aceE* e *aceF* provenientes de *E. coli* foram inseridos no pGV1334 utilizando uma abordagem semelhante à descrita acima. O gene *aceE* foi amplificado a partir do DNA genômico de *E. coli* utilizando dos primers Gevo-606 e Gevo-607, digerido com *Sa*I + *Xho*I e clonado no vetor pGV1334 cortado com *Sa*I + *Xho*I, rendendo pGV1379. O *aceE* inserido foi sequenciado na sua totalidade. Para obter um plasmídeo com um marcador prototrófico diferente selecionável apropriado para expressão *S. cerevisiae*, o *aceE* inserido foi clonado fora do pGV1379 como fragmento *Sa*I + *Xho*I e clonado em *Sa*I + *Xho*I cortado pGV1104 produzindo pGV1603.

O gene *aceF* foi amplificado a partir do DNA genômico de *E. coli* utilizando os primers Gevo-653 e Gevo-609. O produto resultante de 1,9 kb foi digerido com *Sa*I + *Xho*I e clonado no vetor pGV1334, cortado com as mesmas enzimas, produzindo pGV1380. O *aceF* inserido foi sequenciado na sua totalidade. Para obter um plasmídeo com um marcador diferente selecionável para expressão *S. cerevisiae* adequada, o *aceF* inserido foi clonado a fora de pGV1380 e clonado em pGV1105, produzindo pGV1604.

Para expressar estas proteínas em *S. cerevisiae*, a espécie *S. cerevisiae* Gevo1187 (CEN. PK) foi transformado com qualquer combinação de pGV1334, pGV1603, e pGV1604, e transformantes selecionados em meios de abandono adequados, como descrito no Exemplo 3. Como um controle, as células foram transformadas com os vetores vazios correspondentes - pGV1103, pGV1104, e pGV1105, respectivamente. Culturas cultivadas a partir de transformantes foram analisadas para expressão LpdA, AceE, ou AceF através da preparação de extratos brutos de proteína da levedura e analisando-os pelo Western blotting (baseado na detecção do epítipo Myc presente em cada proteína), conforme descrito no Exemplo 2.

Exemplo 6. Clonagem de subunidades de *S. cerevisiae* PDH a partir do DNA genômico, modificado para remover sequências direcionadas endógenas mitocondriais, e sua expressão em células de *S. cerevisiae*.

Na maioria dos eucariotas, o complexo piruvato desidrogenase (PDH) está localizado no interior da mitocôndria. As várias proteínas compreendendo PDH são direcionadas para ingressar a mitocôndria, em virtude do seu teor, em sua região N-terminal, em torno de 20 a 40 aminoácidos comumente conhecidos como uma sequência direcionada mitocondrial. A presença de tal sequência pode ser determinada experimentalmente ou computacionalmente (por exemplo, o programa MitoProt: <http://mips.qsf.de/cqi-bin/proi/medqen/mitofilter>). O sucesso da importação mitocondrial da proteína é seguido por clivagem proteolítica específica e da remoção da sequência direcionada, resultando em uma de "clivados" importados. É bem-conhecido que a remoção de tal sequência a partir de uma proteína por alteração genética da sua sequência de codificação faz com que as proteínas se tornem incapazes de transitar na mitocôndria. Dessa forma, uma estratégia atraente para

redirecionar uma proteína normalmente mitocondrial para o citosol envolve apenas a expressão que parte do gene que codifica a parte "clivada" proteína restante após importação mitocondrial e posterior clivagem de protease.

O objetivo deste exemplo é o de descrever a clonagem de vários dos genes compreendendo o complexo piruvato desidrogenase de *S. cerevisiae* e, a expressão e a detecção desses genes em uma cultura de células de *S. cerevisiae*.

Muitos dos genes que codificam subunidades da PDH foram clonados por PCR, utilizando essencialmente o procedimento descrito no Exemplo 5, exceto o modelo do DNA genômico de *S. cerevisiae*. O gene *S. cerevisiae* a ser amplificado e os primers correspondentes que foram utilizados estão apresentados na Tabela 1.

Para gerar genes que codificam proteínas previstas para serem localizadas no citosol, o primeiro primer listado em cada par de primers (listado na Tabela 1) foi designado para amplificar uma região de cada gene a jusante da parte prevista para codificar a sequência mitocondrial direcionada. Os produtos PCR resultantes foram clonados no vetor pGV1103 utilizando locais únicos de restrição enzimática codificados nos primers utilizados para amplificar cada gene, rendendo os plasmídeos listados na Tabela 2. Cada inserção foi sequenciada na sua totalidade. Para testar a expressão de cada gene, a espécie *S. cerevisiae* Gevo1187 (CEN. PK) foi transformada individualmente com cada um dos pGV1381, pGV1383, pGV1384, ou pGV1385, seguindo basicamente o procedimento descrito no Exemplo 3, e selecionando colônias HIS⁺ em meio de abandono SC-his definido. A expressão protéica foi testada por preparação de lisado e Western blotting (para detectar a etiqueta Myc presente em cada proteína), conforme descrito (Exemplo 2).

Exemplo 7. Profético. Clonagem e expressão de subunidade de *S. cerevisiae* LPD1 e sua expressão em células de *S. cerevisiae*.

Este Exemplo profético descreve como clonar o gene *LPD1* a partir do DNA genômico de *S. cerevisiae* por PCR, e como detectar a expressão de *LPD1* em uma célula hospedeira em *S. cerevisiae*.

A leitura aberta de *Lpd1* faltando aqueles nucleotídeos previstos para codificar a sequência mitocondrial direcionada são amplificadas utilizando os primers Gevo-658 mais o Gevo-659 em uma reação de PCR, essencialmente, como descrito no Exemplo 5. Um produto de 1.5kb é digerido com *Xho*I + *Bam*HI e clonado em pGV1103 cortado com a mesma enzima de restrição. O clone resultante, pGV1103-*lpd1*, é transformado em Gevo1187 e colônias resultantes são selecionadas por prototrofia HIS⁺, essencialmente, como descrito no Exemplo 3. Uma cultura de células contendo pGV1103-*lpd1* é cultivada e a expressão *LPD1* é detectada através da colheita de células seguida pelo Western blotting (para a etiqueta Myc presentes na proteína) essencialmente como descrito no Exemplo 2.

Exemplo 8. Profético. Clonagem de subunidades PDH de *E. coli* e sua expressão

em *K. lactis*

Algumas leveduras, especialmente aquelas conhecidas como "Crabtree negativas", oferecem vantagens distintas como uma produção de hospedeiro. Diferentemente espécies Crabtree-positivos isolados (por exemplo, *Saccharomyces cerevisiae*), que fermentam o excesso de glicose para etanol em condições aeróbias, espécies Crabtree-negativa isoladas, tais como as aquelas do gênero *Kluyveromyces*, irão ao invés de metabolizar glicose através do ciclo TCA produzir biomassa. Consequentemente, leveduras de Crabtree-negativos são tolerantes de inativação (durante o crescimento aeróbico) da assim chamada rota de passagem secundária PDH de dissimilação de glicose, que pode ocorrer, por exemplo, pela supressão do gene *KIPDC1*.

O Exemplo profético seguinte descreve como clonar os genes que codificam as três subunidades de *E. coli* em vetores PDH adequados para a expressão da levedura *Kluyveromyces lactis*, e também como detectar a expressão desses genes.

O gene de *E. coli* *lpdA*, *aceE*, e *aceF* são amplificados por PCR, como descrito no Exemplo 5. Os produtos PCR resultantes são digeridos com *SaI* + *XhoI* e clonado no vetor pGV1428, pGV1429, e pGV1430, respectivamente, de cada corte *SaI* + *XhoI*. Estas etapas produzem os plasmídeos pGV1428-*lpdA*, pGV1429-*aceE*, e pGV1430-*aceF*. Cada inserção é sequenciada em sua espécie entiretyA de *K. lactis* (por exemplo, Gevo1287) é transformada com uma ou qualquer combinação destes plasmídeos de acordo com métodos conhecidos (por exemplo, Kooistra R, Hooykaas PJ, Steensma HY. (2004) *Yeast*. 15, 21 (9):781-92), e colônias resultantes são selecionadas por prototrofias adequadas. Culturas cultivadas a partir de transformantes são testados para expressão *LpdA*, *AceE*, ou *AceF* utilizando extratos brutos de proteínas da levedura e análise ocidental do borrão (com base na detecção do epítipo Myc presente em cada proteína), conforme descrito no Exemplo 2.

Exemplo 9. Profético. Medição de atividade PDH nas células superexpressando subunidades PDH.

O objetivo deste exemplo é o de descrever como a atividade PDH pode ser medida por meio de um ensaio in vitro.

Um método para quantificar a atividade PDH em uma célula de lisado é descrito na literatura: (Wenzel TJ, et al. (1992). *Eur J Biochem* 209 (2) :697-705). Este método utiliza um lisado derivado de uma fração celular enriquecida em mitocôndrias. Uma modalidade diferente deste método utiliza, como uma fonte de PDH, lisados de células obtidas a partir de células inteiras. Tais lisados são preparados conforme descrito anteriormente (Exemplo 2). Outra modalidade do presente método ensaio utiliza um lisado de célula derivado de uma fração celular altamente enriquecido para proteína citosólica (não-mitocondrial). Este fracionamento bioquímico irá reduzir a contribuição de PDH mitocondrial endógeno no ensaio. Métodos para preparar tais lisados enriquecidos estão disponíveis comercialmente e bem-

conhecidos àqueles versados na técnica; (ex. Mitochondrial / cytosol Fractionation Kit, Bio-Vision, Inc., Mountain View, CA).

Em outra modalidade, a atividade PDH é imunopurificada de células, em virtude da presença de uma etiqueta de epítipo Myc codificado em uma ou mais da expressão plasmidial. Métodos para imunopurificar proteínas epítopes marcadas são bem-conhecidas por aqueles versados na técnica (por exemplo, Harlow e Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (1988) CSHL Press). O PDH imunopurificada complexo é, portanto, distinto dos complexos endógenos e serve como fonte de atividade no referido ensaio PDH in vitro.

Exemplo 10. Profético. Medição do acetil-CoA intracelular elevado em células superexpressando PDH.

O objetivo deste exemplo é o de descrever como níveis intracelulares de acetil-CoA, um produto de PDH, podem ser medidos em uma população de células de levedura cultivadas.

Para medir acetil-CoA intracelular, aqueles transformantes de leveduras que realizam combinações de plasmídeo apropriado necessárias para expressar o conjunto completo de genes PDH (por exemplo, pGV1334, pGV1603, e pGV1604) serão avaliados por níveis de acetil-CoA celulares, em comparação com o transformantes que controlam apenas vetor (por exemplo, pGV1103, pGV1104, e pGV1105). Células de leveduras são cultivadas à saturação em meio de abandono definido adequado (por exemplo, SC-His,-Leu,-Trp) no agitar de frascos. A densidade óptica (OD600) da cultura é determinada e células peletizadas por centrifugação a 2800xg por 5 minutos. As células são lisadas utilizando um glóbulo batedor e os lisados são utilizados para determinação da proteína e análise para determinação de acetil-CoA com métodos estabelecidos (Zhang et al, *Conexão de Propionil-CoA Metabolismo para Polyketide biosynthesis em Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 168:785 -- 794).

Exemplo 11. Profético. A co-expressão de genes de subunidades PDH de *E. coli* e um percurso da produção de butanol em *S. cerevisiae*.

O objetivo deste exemplo é o de descrever a forma como os genes que codificam subunidades PDH de *E. coli* serão co-expressadas com os genes que compreendem um percurso da produção de butanol, no *Saccharomyces cerevisiae* hospedeiro. Co-expressar PDH com um percurso da produção de butanol irá aumentar o rendimento do butanol produzido em relação a apenas expressar o percurso de butanol sem o PDH funcional expresso de forma anormal no citosol.

O genes clonados *lpdA*, e *aceE* e *aceF* (ver Exemplo 5), são subclonados em plasmídeos dos genesdo percurso de butanol, especificamente pGV1208, pGV1209 e pGV1213 (Tabela 2). Para fazer isso, pGV1334, pGV1603 e pGV1604 são cada digeridos com as enzimas de restrição EcoICRI mais XhoI, e a inserção resultante liberada é ligada em pGV1208, pGV1209 e pGV1213 que é digerido com *Bam*HI, a protuberância preenchida

por Klenow DNA polimerase, e então digeridos com XhoI, utilizando todos os métodos da biologia molecular padrão (Sambrook, J. Fritsch, EF, Maniatis, T., 1989). Estas etapas produzem pGV1208-lpdA, pGV1209-aceE e pGV1213-aceF, respectivamente. Os plasmídeos resultantes são transformados, juntamente com pGV1227 em Gevo 1187 e selecionado para prototofia HIS, LEU, TRP e URA, todos essencialmente como descrito no Exemplo 3. Espécies transformadas com os plasmídeos parentais pGV1208 mais pGV1209 mais pGV1213 mais pGV1227 são utilizados como controles, para avaliar os efeitos da co-expressão PDH na produção de butanol. A produção de butanol é desempenhada conforme descrito no Exemplo 4. O rendimento esperado de n-butanol é superior a 10%.

Exemplo 12. Profético. Geração de uma forma de PDH que é funcional em condições anaeróbicas, ou em condições de excesso de NADH.

O objetivo deste exemplo é o de descrever o isolamento de uma forma mutante do PDH, que é ativo por via anaeróbia, ou seja, é ativo na presença de um raio elevado $[NADH]/[NAD^+]$ relativo ao raio presente durante o crescimento aeróbia normal. Essa forma de um mutante PDH é desejável na medida em que pode permitir a atividade enzimática PDH continuada mesmo sob condições anaeróbicas ou microaeróbicas.

Métodos para identificar e obter versões alteradas de PDH que permitem atividade microaeróbica ou anaeróbia foram descritos anteriormente: (Kim, Y. et al. (2007). Appl. Environm. Microbiol., 73, 1766-1771; Pedido de Patente U.S. Nº 11/949,724, que é incorporado na íntegra aqui).

Exemplo 13. Profético. A co-expressão de genes de subunidade PDH *E. coli* e um percurso da produção de butanol em uma espécie *S. cerevisiae* com atividade reduzida ou ausente de piruvato descarboxilase.

O objetivo deste exemplo é o de descrever a forma como os genes que codificam subunidades PDH *E. coli* são co-expressados com genes compreendendo um percurso da produção de butanol, em uma espécie *Saccharomyces cerevisiae* com atividade reduzida ou ausente de piruvato descarboxilase (PDC). Ambos os PDC e PDH utilizam e, portanto, competem para recursos disponíveis de piruvato. Considerando que o produto de PDH, acetil-CoA, pode ser diretamente utilizado pelo percurso do butanol, o produto do PDC, acetaldeído, ainda pode ser reduzido a etanol (através de álcool desidrogenase), um produto lateral indesejável da fermentação do butanol, ou pode ser convertido em acetil-CoA através da ação concertada de acetaldeído desidrogenase acrescido de acetil-CoA sintetase. Assim, reduzir ou eliminar a atividade PDC irá aumentar o rendimento do butanol a partir de piruvato em uma célula também superexpressando PDH funcional no citosol.

Geração de uma espécie de pdc- de *S. cerevisiae*.

Espécies de *S. cerevisiae* com atividade PDC reduzida ou ausente são descritas na literatura (por exemplo, Flikweert, MT, et al., (1996). Levedura 15; 12 (3) :247-57; Flikweert

MT, et al., (1999). FEMS Microbiol Lett. 1; 174 (1) :73-9; van Maris AJ, et al., (2004) Appl Environ Microbiol. 70 (1): 159-66. e são bem-conhecidas aos versados na técnica. Em uma modalidade, uma espécie de *S. cerevisiae* carecendo de toda a atividade PDC tem o genótipo *pdc1Δ pdc5Δ pdc6Δ*. Tais espécies carecem de atividade PDC detectável e são incapazes de crescer em glicose como única fonte de carbono, mas pode viver, quando o meio é suplementado com etanol ou acetato como uma fonte alternativa de carbono. Em outra modalidade, um derivado desta espécie tem evoluído para crescer em glicose, uma fonte de carbono conveniente e comumente utilizada. Uma terceira modalidade de uma espécie com muita atividade PDC reduzida é uma espécie do respectivo genótipo *pdc2Δ*, também descrita na literatura (Flikweert MT, et al., (1999). Biotechnol Bioeng. 66 (1) :42-50). Quaisquer dessas espécies podem servir como um hospedeiro útil para a expressão de um percurso de PDH mais butanol. Se necessário, qualquer espécie mutante de *pdc-* será projetada, por meio de padrão de biologia molecular e técnicas genéticas de levedura, para que disponibilizem esses marcadores auxotróficos tais que os plasmídeos pGV1208-*lpdA*, pGV1209-*aceE*, e pGV1213-*aceF* pode ser selecionada e mantida estável dentro de uma célula hospedeira. Essa projeção genética terá lugar por causa da ruptura do gene endógeno relevante através da fita de rompimento baseado em *URA3*, com posterior remoção do marcador *URA3* pela seleção FOA.

Produção do Butanol em uma espécie *pdc-* superexpressando PDH.

Os genes clonados *lpdA*, *aceE* e *aceF* (ver Exemplo 5), estão subclonados em genes de plasmídeos no percurso do butanol, especificamente pGV1208, pGV1209 e pGV1213 (Tabela 2), essencialmente como descritas no Exemplo 11.

O conjunto de plasmídeos pGV1208-*lpdA* mais pGV1209-*aceE* mais pGV1213-*aceF* mais pGV1227, ou o conjunto pGV1208 mais pGV1209 mais pGV1213 mais pGV1227 como um controle, são transformados em espécie mutante de levedura *pdc-* e colônias cultivadas resultantes em de cultura líquida. A produção de butanol é desempenhada conforme descrito no Exemplo 4. O rendimento de *n*-butanol esperado é superior a 50%.

É provável que espécies com atividade PDC diminuída ou ausência de irá apresentar um defeito de crescimento acentuado, e, portanto, pode ter de ser complementado com uma fonte adicional de carbono (por exemplo, acetato ou etanol). Uma vez que o defeito no crescimento do *pdc-* *S. cerevisiae* resulta de sua falta de recursos citoplasmáticos do acetil-CoA, espera-se que o sucesso da expressão PDH no citosol gere acetil-CoA suficiente para salvar este defeito no crescimento. Essa recuperação do crescimento pode servir como uma leitura útil *in vivo* da atividade PDH no citosol.

Exemplo 14 (profético). Expressão de PFL (Piruvato Formiato liase) e FDH1 (Formiato dehidrogenase) em *Saccharomyces cerevisiae*.

Clonagem de *E. coli pflB* (Piruvato Formiato liase inativo) e *pflA* (ativação enzimática).

ca de Piruvato Formiato liase).

Para a clonagem de *Escherichia coli pflB* e *pflA*, os genes são amplificados utilizando DNA genômico de *E. coli* e primers *pflB_forw*, *PflB_rev* e *PflA_forw*, *PflA_rev*, respectivamente. Para a clonagem do gene de *Candida boidinii FDH1 (CB-FDH1)*, DNA genômico de *Canida boidinii* é utilizado com primers *fdh_forw* e *fdh_rev*. Utilizando os locais de restrição, *SalI* e *EcoRI* incorporados nos primers de amplificação genes direto e reverso, respectivamente, o DNA é ligado para *SalI* e *EcoRI* pGV1103 digerida, pGV1104 e pGV1102 yielding pGV1103pflA, pGV1104pflB e pGV1002fdh1. As proteínas expressas a partir de plasmídeos resultante são marcadas com etiquetas myc, myc e HA, respectivamente.

Os plasmídeos resultantes (pGV1103pflA, pGV1104pflB e pGV1002fdh1) e vetores (pGV1103, pGV1104and pGV1102) são utilizados para transformar a espécie de levedura Gevo 1187, como indicado por exemplo 3 para produzir PflA, PFIB, Fdh1 expressando (PFL+) e controlar transformantes (PFL-). Ambos os conjuntos de transformantes são escolhidos através de seleção por prototrofia HIS, TRP e URA.

A transformantes resultantes são avaliados pela expressão PflA, PFIB e Cb-Fdh1 utilizando extrato bruto de proteína de levedura e pela análise ocidental do borrão, tal como descrito no Exemplo 2.

Estes transformantes de leveduras verificados para expressar todas as três proteínas são avaliados por níveis celulares de acetil-CoA, em comparação com o vetor que controla apenas transformantes. Para isso, as células de PFL + e PFL são cultivadas em meio SC-ura, his, trp em formato de frasco de agitação. A densidade óptica (OD600) da cultura determinada e células peletizadas por centrifugação a 2800 xrcf por 5 minutos. As células são lisadas utilizando um glóbulo batedor e os lisados são utilizados para determinação de proteínas e análise para determinação de acetil-CoA com métodos estabelecidos (Zhang et al, Connection de Propionyl-CoA Metabolism to Polyketide Biosynthesis em *Aspergillus nidulans*. Genetics, 168:785 -- 794). As quantidades de Acetil-CoA são avaliadas por mg de proteína total celular.

Para avaliar o efeito da expressão PflA, PFIB Fdh1 na produção de n-butanol, *pflA*, *pflB* e *Cb-FDH1* são subclonados genes do percurso do butanol contendo pGV1208, pGV1209 e pGV1213 (Tabela 1). Para isso, pGV1103pflA, pGV1104pflB e pGV1002fdh1 são digeridos com enzimas de restrição *EcoRI* + *XhoI* e ligados em pGV1208, pGV1209 e pGV1213 digeridos com *BamHI* (e, posteriormente, terminada às cegas com Klenow Fill-in) + *XhoI* utilizando métodos padrão da biologia molecular (Sambrook, J. Fritsch, EF, Maniatis, T., 1989) para produzir pGV1208PflA, pGV1209PflB e pGV1213Fdh1. Os plasmídeos resultantes, juntamente com pGV1227 são transformados em Gevo 1187 e selecionados por prototrofia HIS, Leu, Trp e Ura. Gevo1110 e Gevo1111 são utilizados como controles isolados (Tabela 1). A produção de butanol é realizada conforme descrito no Exemplo 4. O rendimento

to esperado de n-butanol é superior a 10%.

Exemplo 15. (Profético). Expressão PflA, PFIB Fdh1 em *Saccharomyce cerevisiae* com atividade reduzida ou ausente de piruvato descarboxilase

A clonagem de *E. coli pflB* (Piruvato Formiato liase inativos) e *pflA* (ativação enzimática de Piruvato Formiato liase) e *Cb-FDHI* é feito conforme descrito no Exemplo 14.

Os plasmídeos resultantes (pGV1103pflA, pGV1104pflB e pGV1002fdh1) e vetores (pGV1103, pGV1104 e pGV1102) são utilizados para transformar espécies de levedura de *S. cerevisiae* (genótipo pertinente: *ura3*, *trp1*, *his3*, *leu2*, *cdc1*, *cdc5*, *cdc6*) como indicado pelo exemplo 3 para render PflA, PFIB, Cb-FDM expressando (PFL+) e transformantes de controle (PFL-). Ambos os conjuntos de transformantes são escolhidos através de seleção por prototrofia HIS, TRP e URA.

Os transformantes resultantes serão avaliados por expressão PflA, PFIB e Fdh1 utilizando extrato bruto de proteínas da levedura e por análise ocidental do borrão, tal como descrito no Exemplo 2.

Estes transformantes de leveduras verificados para expressar todas as três proteínas são avaliados por níveis celulares de acetil-CoA, em comparação com os transformantes que controlam apenas os vetores como descrito no Exemplo 14.

Para avaliar o efeito de expressar PflA, FDM PFIB na produção de n-butanol, pGV1208PflA1 pGV1209PflB e pGV1213Fdh1 juntamente com pGV1227 transformam-se em *S. cerevisiae* (MAT A, *ura3*, *trp1*, *his3*, *leu2*, *cdc1*, *cdc5*, *cdc6*) e selecionado por prototrofia HIS, Leu, Trp e Ura. Gevo 1110 e 1111 são utilizados como controle isolado (Tabela 1). A produção de butanol é realizada conforme descrito em Exemplo 4. O rendimento de n-butanol esperado é superior a 50%.

Exemplo 16. (Profético) Expressão PFI e Fdh1 em *Saccharomyces cerevisiae* com atividade ADH1 reduzida ou ausente

Clonagem de *E. coli pflB* (Piruvato Formiato liase inativo) e *pflA* (ativação enzimática de Piruvato Formiato liase)

A clonagem de *E. coli pflB* (Piruvato Formiato liase inativo) e *pflA* (ativação enzimática de Piruvato Formiato liase) e *Cb-FDHI* é feito conforme descrito no Exemplo 14.

Os plasmídeos resultantes (pGV1103pflA, pGV1104pflB e pGV1002fdh1) e vetores (pGV1103, pGV1104 e pGV1102) são utilizados para transformar a espécie de levedura Gevo 1253 (*adh1Δ*), conforme descrito no Exemplo 3 para produzir PflA, PFIB, Fdh1 expressando (PFL+) e transformantes de controle (PFL-). Ambos os conjuntos de transformantes são escolhidos através de seleção por prototrofia HIS, TRP e LJRA.

Os transformantes resultantes serão avaliados para expressão PflA, PFIB e Fdh1 utilizando extrato bruto proteínas da levedura e pela análise ocidental do borrão, tal como descrito no Exemplo 2.

Estes transformantes de leveduras verificados para expressar todas as três proteínas são avaliados por níveis celulares de acetil-CoA, em comparação com os transformantes que controlam apenas vetores como descrito no Exemplo 14.

Para avaliar o efeito da superexpressão PflA, PFIB e Fdh1 na produção de n-butanol, pGV1208PflA, pGV1209PflB e pGV1213Fdh1 juntamente com pGV1227 são transformados em Gevo 1253 e selecionado por protorofia His, Leu, Trp e Ura. Gevo 1110 e 1111 são utilizados como controle isolado (Tabela 1). A produção de butanol é realizada conforme descrito no Exemplo 4. O rendimento esperado de n-butanol é maior do que 10%.

Exemplo 17. Clonagem de genes PDC1 de *S. cerevisiae*, e sua superexpressão em *S. cerevisiae*.

O objetivo deste exemplo é o de descrever a clonagem de um gene que codifica piruvato descarboxilase sob o controle de um promotor constitutivamente ativo, e para descrever a expressão de tal gene, em uma célula hospedeira de *S. cerevisiae*.

O PDC1 ORF completo foi amplificado a partir do DNA genômico de *S. cerevisiae* utilizando primers Gevo-639 mais Gevo-640, em uma reação de PCR, que foi realizada essencialmente como descrito (Exemplo 5). O produto resultante de 1.7kb foi digerido com *Xho*I + *Bam*HI e ligado ao vetor pGV1106, que foi cortado *Sa*I + *Bam*HI, produzindo pGV1389 (ver Tabela 2). A inserção foi sequenciada na sua totalidade.

Para superexpressar Pdc1 em *S. cerevisiae*, a espécie *S. cerevisiae* Gevo1187 (CEN.PK) foi transformado com pGV1389, e transformantes selecionados em meio de abandono SC-ura, como descrito no Exemplo 3. Culturas cultivadas a partir de transformantes foram analisadas por expressão pdc1 utilizando extrato bruto de proteínas da levedura e por análise ocidental do borrão (com base na detecção do epítipo Myc presente na proteína recombinante expressa), conforme descrito no Exemplo 2.

Exemplo 18. Clonagem para permitir expressões induzíveis de um gene de piruvato descarboxilase.

A expressão constitutiva de um gene, por exemplo, piruvato descarboxilase, pode ser indesejável em certos pontos durante um crescimento da cultura, ou podem exercer uma pressão inesperada metabólica ou seletiva sobre aquelas células superexpressas. Assim, existe a necessidade de empregar um sistema de expressão gênica regulada, em que um gene de interesse pode ser expresso principalmente em um momento ótimo para maximizar o crescimento da cultura, bem como o desempenho em uma fermentação posterior.

O objetivo deste exemplo é o de descrever a clonagem de um gene que codifica a enzima piruvato descarboxilase sob o controle de um promotor regulado induzivelmente, e para descrever a expressão de tal gene, tais em uma célula hospedeira *S. cerevisiae*.

O PDC1 ORF presente em pGV1389 (ver Exemplo 19) foi liberado como um fragmento *Xba*I + *Bam*HI e clonado no vetor pGV1414 que tinha sido digerido *Avr*II + *Bam*HI,

produzindo vectores pGV1483. O vector pGV1483 (Tabela 2), desse modo, caracteriza o gene promotor *MET3* de *S. cerevisiae* (SEQ ID NO: 177) conduzindo a expressão do gene *PDC1*. O promotor *MET3* é transcricionalmente mudo na presença de metionina, mas torna-se ativo quando os níveis de metionina caem abaixo de um determinado limite. O plasmídeo pGV1483 é transformado em Gevo 1187 e transformantes resultantes são identificados pela seleção em meios SC-ura, tal como descrito no Exemplo 3. Culturas de Gevo 1187 transportando pGV1483 são cultivados e testados pela expressão *PDC1* essencialmente como descrito no Exemplo 2.

Em outra modalidade deste exemplo, o gene *PDC1* é expresso sob o controle do gene promotor *CUP1* induzíveis por cobre de *S. cerevisiae* (SEQ ID NO: 178). Primeiro, o gene promotor *CUP1* foi amplificado por PCR a partir do DNA genômico de *S. cerevisiae* utilizando primers em uma reação essencialmente como descrito em (Exemplo 5). O produto PCR foi digerido *SacI* + *SalI* e inserido em pGV1106 que foi cortado *SacI* + *SalI*, produzindo pGV1388. A sequência promotora inserida *CUP1* foi sequenciada na sua totalidade. Em seguida, um fragmento *XbaI* + *BamHI* contendo o gene *PDC1* proveniente de pGV1389 é inserido no *AvrII* + *BamHI* digerido pGV1388, produzindo pGV1388-*PDC1*. O Plasmídeo pGV1388-*PDC1* é transformado em Gevo 1187, conforme descrito no Exemplo 3, e transformantes são identificados no meio SC-ura definido carente de cobre. Culturas de células transformadas são cultivadas em meio SC-ura sem suplementação de cobre até atingirem um OD600 de > 0,5, momento em que o sulfato de cobre é adicionado a uma concentração final de 0,5 mM. As culturas são cultivadas por mais 24 h a 48 h, conforme o desejado, e depois testadas para a expressão de *Pdc1* por análise ocidental do borrão, essencialmente como descrito (Exemplo 2).

Exemplo 19. Profético. Um ensaio in vitro para medir a atividade PDC produzida em uma cultura de células de levedura superexpressando uma enzima de piruvato descarboxilase.

O objetivo deste exemplo é o de descrever um ensaio in vitro útil para determinar o total da atividade de piruvato descarboxilase presente em uma célula, e em particular a partir de uma população de células superexpressando uma enzima PDC.

Ensaio para medir a atividade de PDC a partir de lisados celulares totais foram descritas e são bem-conhecidos para aqueles versados na técnica (Maitra PK Lobo & Z. 1971. J Biol Chem. 25, 246 (2) :475-88. ; Schmitt HD & Zimmermann FK. 1982. J bactéria. 151 (3): 1146-52; Eberhardt et al., (1999) Eur. J. Biochem. 262 (1) ,191-201).

Em outra modalidade deste exemplo, a atividade PDC gerada pela expressão do *PDC*, tal como descrito nos exemplos 17 e 18 é medida pela primeira imuno precipitação *PDC*, utilizando um anticorpo específico dirigido contra *PDC*, ou utilizando um anticorpo dirigido contra o epitopo de etiqueta Myc, que está presente no *PDC* superexpressado (mas

não endógeno), como expressado nos Exemplos RF20 e RF21. Métodos para immuno precipitar especialmente proteínas presentes em uma mistura complexa são bem-conhecidos por aqueles versados na técnica (por exemplo, Harlow e Lane, 1988, Antibodies: A Laboratory Manual, CSHL Press). O PDC immuno precipitado complexos então servem como
 5 fonte de material para ser analisado utilizando os ensaios acima referidos. Este método permite, assim, a dosagem específica de PDC anormais, superexpressados.

Exemplo 20. Profético. Aumento da produtividade do butanol resultante da superexpressão de PDC em *S. cerevisiae*, que também tem um percurso funcional na produção do butanol.

10 O objetivo deste exemplo é para ilustrar a forma como a superexpressão de PDC aumenta a produtividade de butanol em uma cultura de *Saccharomyces cerevisiae* expressando também um percurso de produção do butanol.

A espécie de *S. cerevisiae* superexpressando um gene PDC tem sido descrito anteriormente (van Hoek et al., (1998). Appl Environ Microbiol. 64 (6) :2133-40). Estas experiências revelaram que (1) níveis de PDC endógeno em *S. cerevisiae*, embora compreendendo
 15 até 3,4.% do total de proteínas celulares, pode ser ainda aumentada pela presença de uma construção de superexpressão; e (2) a capacidade fermentativa (a taxa máxima específica de produção de etanol), de culturas superexpressando PDC em altas taxas de crescimento foi um aumentada em relação à espécies de controle. Estes resultados sugerem que a superexpressão de PDC, sob determinadas condições de crescimento, elevem o fluxo através
 20 de um percurso anormal produção de butanol fornecido.

Para superexpressar um gene PDC na presença de um percurso de butanol, o gene *PDC1* excisado a partir de pGV1389 por digestão com *SpeI*, o corte da protuberância do DNA é preenchido com fragmento de DNA polimerase Klenow, e em seguida, o vetor digerido
 25 do com *XhoI*. O fragmento é inserido no pGV1213 que é digerido com *BamHI*, o corte termina preenchido com enzima Klenow e, em seguida, digerido com *XhoI*, produzindo plásmido pGV1605. O plasmídeo pGV1605 ou pGV1057 (Mumberg, D., et al. (1995) Gene 156:119-122) é transformado em Gevo 1187, juntamente com plasmídeos pGV1208, pGV1209, e pGV1213, essencialmente como descrito (Exemplo 3), e selecionado por prototrofia His,
 30 Leu, Trp e Ura. Fermentações são realizadas para produzir butanol, que é medido conforme descrito (Exemplo 4). A inclusão de pGV1605 resulta em maior produtividade de butanol (quantidade de butanol produzido por unidade de tempo) que faz a inclusão de pGV1057 com plasmídeos pGV1208, pGV1209, e pGV1213 nas fermentações acima-referidas. O n-butanol rendimento esperado é superior a 5%.

35 Exemplo 21. Profético. Aumento da produtividade de butanol resultante da superexpressão PDC em uma célula *S. cerevisiae* que tem atividade reduzida de álcool desidrogenase, e que contém também um percurso de produção funcional de butanol.

O objetivo deste exemplo é demonstrar como a produtividade elevada do butanol é obtida superexpressando um gene PDC na presença de um percurso de produção do butanol, em uma espécie de levedura deficiente em atividade de álcool desidrogenase (ADH).

Acetaldeído gerado a partir de piruvato pelo PDC tem dois destinos principais: ele ainda pode ser metabolizado a acetil-CoA pela ação de acetaldeído desidrogenase e acetil-CoA sintetase, em que pode, então, ser um substrato útil para um percurso sintético do butanol, ou, ele ainda pode ser metabolizado por um processo redutor para o etanol, pela ação de uma enzima de álcool desidrogenase (ADH). Portanto, diminuir ou eliminar ADHs, especialmente aquelas enzimas (ADH) com uma preferência para acetaldeído, reduziria ou eliminaria esta indesejável rota de dissimilação de acetaldeído e aumentaria recursos de acetil-CoA disponíveis a um percurso de butanol.

Os plasmídeos pGV1208, pGV1209, pGV1213, e pGV1605 são simultaneamente co-transformados em espécie Gevo 1187, que tem o genótipo pertinente *ADH1⁺*, ou em espécie Gevo1266, que tem o genótipo *adh1Δ* relevante. Colônias transformadas são selecionadas por prototrofia His, Leu, Trp e Ura, essencialmente, como descrito no Exemplo 3. Fermentações são realizadas para produzir butanol, que é medido conforme descrito no Exemplo 4. O rendimento esperado de n-butanol é superior a 10%. A espécie Gevo1266 (*adh1A*) apresenta uma melhora de rendimento de butanol sobre uma fermentação paralela realizada em espécie Gevo 1187 (*ADH1⁺*).

Exemplo 22. Profético. Aumento do rendimento de butanol resultante de superexpressão PDC em uma célula *K.lactis* com atividade reduzida de álcool desidrogenase e expressando um percurso funcional produção de butanol.

O objetivo deste exemplo é o de descrever a produção de butanol em uma espécie *K. lactis* com atividade ADH grandemente reduzida ou ausente. Prevê-se que a expressão de um percurso de butanol em tal espécie produzirá significativamente maiores rendimentos de butanol por entrada de glicose do que a expressão de um percurso de butanol em uma espécie com atividade ADH.

Geração de uma espécie *Kluyveromyces lactis* com reduzida atividade de álcool desidrogenase.

Métodos para transformar células de e romper genes em *Kluyveromyces lactis* - ou seja, para substituir uma moldura de leitura aberta funcional com um marcador selecionável, seguido pela remoção posterior do marcador - foram descritos anteriormente (R Kooistra, Hooykaas PJ, Steensma HY. (2004) Yeast. 15, 21 (9) :781-92). *Kluyveromyces lactis* tem quatro genes que codificam enzimas ADH, dois dos quais, *KIAD1* e *KIADH2*, estão localizadas ao citoplasma. Um mutante derivado do *K. lactis* em que todos os quatro genes foram suprimidos (chamado *K. lactis* ADH^o) tem sido descrito na literatura (Saliola, M., et al., (1994) Yeast 10 (9): 1133-40), bem como as condições de cultura necessárias para crescer

idealmente esta espécie. Uma versão alternativa desta abordagem emprega utilizar um marcador conferindo resistência ao fármaco G418/geneticin, por exemplo, conforme previsto pelo gene *kan*. Essa abordagem é útil na medida em que deixa o marcador *URA3* disponível para utilização como um marcador selecionável em subseqüentes transformações.

5 Expressão de um percurso de expressão do butanol em uma espécie *adhO* de *K. lactis*.

O plasmídeos pGV1208, pGV1209, pGV1213, e pGV1605 são simultaneamente co-transformados em espécie Gevo 1287, que é *ADH⁺*, ou em uma espécie *adh0*. Colônias transformadas são selecionadas por prototrofia His, Leu, Trp e Ura. Fermentações são reali-
10 zadas para produzir butanol, que é medido conforme descrito no Exemplo 4. O rendimento esperado de n-butanol é superior a 10%. A espécie Gevo1287 produz significativamente mais butanol do que a fermentação paralela realizada em outra espécie *adh0* isogênica.

Exemplo 23. (Profético). Superexpressão *ALD6* em *Saccharomyces cerevisiae*.

Para clonar o gene *ALD6* de *S. cerevisiae*, um método de fusão de duas etapas
15 PCR foi empregado que eliminou uma restrição enzimática interna *SalI* do local para facilitar manipulações posteriores de biologia molecular. Dois produtos PCR de sobreposição que abrange a sequência de gene *ALD6* de *S. cerevisiae* foram gerados usando pares de primers Gevo-643 & Gevo-644 e Gevo-645 & Gevo-646 com DNA genômico de *S. cerevisiae* conforme o modelo. O fragmento de PCR resultante foi digerido com *SalI* + *BamHI* e ligado
20 em forma semelhante restrição digeridos pGV1105 e pGV1101 para produzir pGV1321 e pGV1326. Posteriormente, *ALD6* foi subclonado pela digestão dos pGV1321 e pGV1326 com *EcoICRI* + *XhoI* e ligação em *BamHI* (e, posteriormente, terminada às cegas por Klenow preenchido) + *XhoI* digerido pGV1209 e pGV1208 para produzir pGV1339 e pGV1399, respectivamente.

25 Os plasmídeos resultantes (pGV1339 e pGV1399) e vetores (pGV1105 e pGV1101) são utilizados para transformar a espécie de levedura Gevo 1187 como descrito no Exemplo 3 para produzir *ALD6* superexpressando ("*Ald6⁺*"), ou transformantes de controle, respectivamente. Ambos os conjuntos de transformantes são escolhidos através de seleção por prototrofia TRP e LEU em médio de abandono adequado.

30 Os transformantes resultantes são avaliados por expressão *Ald6* utilizando extrato bruto de proteínas da levedura e análise ocidental de borrão, tal como descrito no Exemplo 2.

Estes transformantes de leveduras verificados para expressar proteínas *Ald6* são avaliados para o aumento da atividade de acetaldeído desidrogenase, em comparação com
35 os transformantes que controlam apenas vetores. Para isso, *Ald6⁺* e células de controle são cultivadas em médio abandono apropriado ao agitar frascos. A densidade óptica (OD600) da cultura é determinada e células peletizadas por centrifugação a 2800xg durante 5 minutos.

As células são lisadas utilizando um glóbulo batedor e os lisados são utilizados para determinação da proteína e de análise para atividade de aldeído desidrogenase utilizando métodos estabelecidos (por exemplo, Van Urk et al, Biochim. Biophys. Acta, 191: 769).

Para avaliar o efeito da superexpressão de Ald6 na produção de n-butanol, pGV1339 é transformada em Gevo 1187, juntamente com pGV1208, pGV1227 e pGV1213 e selecionadas por prototrofia His, Leu, Trp e Ura. Gevo 1110 e 1111 são utilizados como controle isolado (Tabela 1). A produção de butanol é desempenhada conforme descrito no Exemplo 4. O rendimento esperado de n-butanol é superior a 5%.

Exemplo 24. (Profético). Superexpressão de Ald6 em um *Saccharomyces cerevisiae* sem atividade de álcool desidrogenase I (adh1Δ).

Clonagem de gene *ALD6* é realizada conforme descrito no Exemplo 23.

Os plasmídeos resultantes (pGV1339 e pGV1399) e vetores (pGV1100 e pGV1101) são utilizados para transformar a espécie de levedura Gevo 1253, como indicado pelo exemplo 3 para o rendimento de superexpressão Ald6+ e transformantes de controle, respectivamente. Ambos os conjuntos de transformantes são escolhidos em meio adequado de abandono.

Os transformantes resultantes serão avaliados por expressão Ald6 utilizando extrato bruto de proteínas da levedura e análise ocidental de borrão, tal como descrito no Exemplo 2.

Estes transformantes de leveduras verificados para expressar proteínas Ald6 serão avaliadas quanto ao aumento da atividade do acetaldeído desidrogenase como descrito no Exemplo 23.

Para avaliar a consequência da superexpressão de produção de n-butanol, pGV1339 será transformada em Gevo 1253, juntamente com pGV1209, pGV1227 e pGV1213 e selecionadas por prototrofia His, Leu, Trp e Ura. Gevo 1110 e 1111 são utilizados como controle isolado (Tabela 1). A produção de butanol é realizada conforme descrito no Exemplo 4. O rendimento esperado de n-butanol é superior a 10%.

Exemplo 25. (Profético). Superexpressão de um gene acetil-CoA sintetase em *Saccharomyces cerevisiae*.

O objetivo deste exemplo é o de descrever a clonagem de um gene que codifica a atividade acefyl-CoA sintetase, bem como a expressão de tal gene em uma célula hospedeira de *S. cerevisiae*. Especificamente, por um ou ambos os genes *S. cerevisiae* ACS1 ou ACS2 codificam a atividade de acetil-CoA sintetase.

Para a clonagem de genes ACS1 e ACS2, DNA genômico de *S. cerevisiae* foi utilizado como modelo com Primers Gevo-479 & Gevo-480 (ACS1) e Gevo-483 & Gevo-484 (ACS2), cada conjunto contendo locais de restrição *SalI* e *BamHI* na nos primers diretos e reversos, respectivamente. O fragmento da PCR resultante foi digerido com *SalI* + *BamHI* e

ligado em restrição similar digeridos pGV1101 e pGV1102 para produzir pGV1262 e pGV1263. Posteriormente, ACS1 e ACS2 foram subclonados pela digestão dos pGV1262 e com pGV1263 EcoICR + XhoI e ligação em BamHI (e, posteriormente, terminado às cegas com Klenow preenchido) + XhoI digerido pGV1213 para produzir pGV1319 e pGV1320 .

5 Os plasmídeos resultantes, pGV1262 e pGV1263, e vetores pGV1101 e pGV1102 são utilizados para transformar a espécie de levedura Gevo 1187 como descrito no Exemplo 3 para produzir superexpressão ACS1+, ACS2+ e transformantes de controle, respectivamente. Ambos os conjuntos de transformantes são escolhidos através de seleção por prototrofia LEU, URA. Os transformantes são avaliados por expressão Acs1 ou Acs2 usando ex-
10 tratos brutos de proteína da levedura e por análise ocidental de borrão, tal como descrito no Exemplo 2.

Estas transformantes de leveduras verificadas para expressar proteínas Acs1 ou Acs2 são avaliados para o aumento da atividade de acetil-CoA sintetase, em comparação com os transformantes que controlam apenas vetores. Para isso, ACS1+ ou ACS2+ e células de controle são cultivadas em meio SC - LEU, URA em formato de frasco de agitação. A
15 densidade óptica (OD600) da cultura determinada e células peletizadas por centrifugação a 2800 x RCF por 5 minutos. As células são lisadas utilizando um glóbulo batedor e os lisados são utilizados para determinação da proteína e para análise da atividade de acetil-CoA sintetase utilizando métodos estabelecidos (Van Urk et al, Biochim. Biophys. Acta, 191: 769).

20 Para avaliação do efeito da superexpressão Acs1 ou Acs2 na produção n-butanol, pGV1319 e 1320 vai ser transformado em Gevo 1187, juntamente com pGV1208, pGV1209 e pGV1227 e selecionadas por prototrofia His, Leu, Trp e Ura. Gevo 1110 e 1111 são utilizados como controle isolado (Tabela 1). A produção de butanol é realizada conforme descrito no Exemplo 4. O rendimento esperado de n-butanol é superior a 5%.

25 Exemplo 26. (Profético). Superexpressão de um acetil-CoA sintetase em célula de *Saccharomyces cerevisiae* sem atividade de álcool desidrogenase I (adh1Δ).

Clonagem de genes ACS1 e ACS2 de *S. cerevisiae* são como descritas no Exemplo 25.

Os plasmídeos resultantes, pGV1262 e pGV1263, e vetores pGV1101 e pGV1102
30 são utilizados para transformar a espécie de levedura Gevo 1253, como indicado pelo exemplo 3 para o rendimento de superexpressão ACS1+, ACS2+ e transformantes de controle, respectivamente. Ambos os conjuntos de transformantes são escolhidos através de seleção por prototrofia LEU, URA. Os transformantes são avaliados por expressão ACS1 ou Acs2 utilizando extratos brutos das proteínas da levedura e análise ocidental do borrão, tal
35 como descrito no Exemplo 25.

Estes transformantes de leveduras verificados para expressar proteínas Acs1 ou Acs2 proteínas são avaliados para o aumento da atividade do acetil-CoA sintetase descrito

no Exemplo 26.

Para avaliação do efeito da superexpressão Acs1 ou Acs2 na produção do butanol, pGV1319 e 1320 vão ser transformados em Gevo 1253, juntamente com pGV1208, pGV1209 e pGV1227 e selecionadas por prototrofia His, Leu, Trp e Ura. Gevo 1110 e 1111
5 são utilizados como controle isolado (Tabela 1). A produção de butanol é realizada conforme descrito no Exemplo 4. O rendimento esperado de n-butanol é superior a 5%.

Exemplo 27. (Profético). Superexpressão ALD6, ACS1 e ACS2 em *Saccharomyces cerevisiae*.

Os genes ALD6, ACS1 e ACS2 são clonados como descrito acima, nos exemplos
10 23 e 25.

Os plasmídeos resultantes pGV1321 e pGV1262 ou pGV1263 e vetores pGV1105 e pGV1102 são utilizados para transformar a espécie de levedura Gevo 1187, tal como indicado pelo Exemplo 3 para produzir superexpressão ALD6+, ACS1+, ALD6+ ACS2+ e controle de transformantes, respectivamente. Ambos os conjuntos de transformantes são esco-
15 lhidos através de seleção por prototrofia LEU e URA.

Transformantes ALD6+ ACS1+ e ALD6+ ACS2+ são avaliados para o aumento da atividade de acetil-CoA sintetase, em comparação com transformantes que controlam apenas o vector. Para isso, ALD6+ ACS1+, ALD6+ ACS2+ e células de controle são cultivadas em meio SC - LEU, URA em formato de frasco de agitação e avaliada conforme descrito no
20 Exemplo 25.

Avaliar o efeito da superexpressão de Ald6 mais Acs1 ou Acs2 resulta em maior produção de butanol, Gevo 1187 é transformado com pGV1208, pGV1339, pGV1227 e pGV1319 ou 1320 e selecionado por prototrofia His, Leu, Trp e Ura. Gevo 1110 e 1111 são utilizados como controle isolado (Tabela 1). A produção de butanol é avaliada conforme
25 descrito no Exemplo 4. O rendimento esperado de n-butanol é superior a 5%.

Exemplo 28. (Profético). Superexpressão ALD6 mais ACS1 ou ACS2 em *Saccharomyces cerevisiae* sem atividade de álcool desidrogenase I (adh1Δ).

Os Genes ALD6, ACS1 e ACS2 são clonados como descrito nos exemplos 23 e 25.

Os plasmídeos resultantes pGV1321 e pGV1262 ou pGV1263 e vetores pGV1105 e pGV1102 são utilizados para transformar a espécie de levedura Gevo 1253 (δ ADH1), como indicado pelo exemplo 3 para produzir superexpressão ALD6+ ACS1+ ou espécies ALD6+ ACS2+ ou controle de transformantes, respectivamente. Ambos os conjuntos de transformantes são escolhidos através de seleção por prototrofia LEU e URA.
30

Os transformantes ALD6+ ACS1+ ou ALD6+ ACS2+ são avaliados para o aumento da atividade de acetil-CoA sintetase, em comparação com transformantes que controlam apenas os vectores. Para isso, ALD6+ ACS1+ ou ALD6+ ACS2+ e células de controle são cultivadas em médio SC - LEU, URA em formato de frasco de agitação e avaliadas confor-
35

me descrito no Exemplo 25.

Para avaliar o efeito da superexpressão SALD6 e ACS1 ou ACS2 na produção de butanol, Gevo 1253 é transformado com pGV1208, pGV1339, pGV1227 e pGV1319 ou 1320 e selecionado por o prototrofia His, LEU, TRP e URA. Gevo 1110 e 1111 são utilizados como controle isolado (Tabela 1). A produção de butanol é realizada conforme descrito no Exemplo 4. O rendimento esperado de n-butanol é superior a 10%.

Exemplo 29. (Profético). Clonagem de um percurso do butanol em vetores de expressão em uma levedura do gênero *Kluyveromyces*.

Para clonar os genes do percurso do butanol em vetores adequáveis de expressão para a espécie *Kluyveromyces lactis*, hbd, Crt, Thi + TER são liberadas a partir de pGV1208, pGV1209 e pGV1227 por digestão com a restrição *SacI* e *NotI* digerido e clonado de forma similar em pGV1428, 1429 e 1430 digerido para produzir pGV1208KI, pGV1209KI e pGV1227KI. Para clonar ADHE2 em *Kluyveromyces lactis*, pGV1213 é digerida com *MluI* e *SacI* e ligado para similarmente pGV1431 digerido para produzir pGV1213KI. Os plasmídeos resultantes pGV1208KI, pGV1209KI, pGV1227KI e pGV1213KI são transformados em *K. lactis* (espécie Gevo 1287; genótipo relevante: MATa, trp1, his3, leu2, ura3) e transformantes são selecionados por prototrofia TRP, SUA, LEU e URA (Kooistra R, Hooykaas PJ, Steensma ORQUÊ. (2004) Yeast. 15, 21 (9) :781-92). A produção de butanol é realizada conforme descrito no Exemplo 4.

Exemplo 30. (Profético). Expressão de Piruvato formiato lyase e Formiate desidrogenase I em *Kluyveromyces lactis*.

Clonagem de *E. coli pflB* (Piruvato Formiato liase inactivos) e *pflA* (ativação enzimática de Piruvato Formiato liase)

Para a clonagem de *Escherichia coli pflB* e *pflA*, os genes são amplificados utilizando DNA genômico de *E. coli* e primers *pflB_forw*, *pflB_rev* e *pflA_forw*, *pflA_rev*, respectivamente. Para a clonagem do gene FDH1 de *Candida boidinii*, DNA genômico de *Candida boidinii* é utilizado como um modelo em uma reação de PCR com primers *fdh_forw* e *fdh_rev*. Utilizando os locais de restrição, *Sal* e *EcoRI* incorporados nos primers de amplificação direto e reverso, respectivamente, o DNA amplificado está ligado no *Sal* e *EcoRI* digerido pGV1428, pGV1429 e pGV1430 produzindo pGV1428pflA, pGV1429pflB e pGV1430fdh1. As proteínas expressas a partir dos plasmídeos resultantes são direcionadas com etiquetas myc para os estudos de expressão protéica.

Os plasmídeos resultantes (pGV1428pflA, pGV1429pflB e pGV1430fdh1) e vetores (pGV1428, pGV1429 e pGV1430) são utilizados para transformar a espécie da levedura *K. lactis* (Gevo 1287; relevant genotype: MatA, trp1, his3, leu2 e ura3) por conhecidos métodos (R Kooistra, Hooykaas PJ, Steensma ORQUÊ. (2004) Yeast. 15, 21 (9) :781-92) para rendimento PflA, PflB, Cb-Fdh1 expressando (PFL +) e controle de transformantes (PFL-). Am-

bos os conjuntos de transformantes são escolhidos através de seleção por prototrofia HIS, TRP e LEU.

Os transformantes resultantes são avaliados para expressão PflA, PflB e Pfh1 utilizando extrato bruto de proteínas da levedura e por análise ocidental do borrão, tal como descrito no Exemplo 2.

Estes transformantes de leveduras verificados para expressar todas as três proteínas são avaliadas por níveis celulares do acetil-CoA, em comparação com os transformantes que controlam apenas vetores. Para isso, células PFL+ e PFL- são cultivadas em meio SC-LEU, HIS, TRP em formato de frasco de agitação. A densidade óptica (OD600) da cultura determinada e células peletizadas por centrifugação a 2800 xrcf por 5 minutos. As células são lisadas utilizando um glóbulo batedor e os lisados são utilizados para determinação de proteínas e análise para determinação do acetil-CoA com métodos estabelecidos (Zhang et al, Connection de Propioniy-CoA Metabolism to Polyketide biosynthesis em *Aspergillus nidulans*. Genetics, 168:785 -- 794). Quantidades de Acetil-CoA são avaliadas por mg de proteína total celular.

Para avaliar o efeito da expressão da PflA, PflB e Fdh1 na produção de butanol, o pflA, pflB e Cb-FDHI são subclonados em genes do percurso do butanol contendo pGV1208KI, pGV1209KI, pGV1227KI e pGV1213KI (Tabela 1). Para isso, pGV1428pflA, pGV1429pflB e pGV1002fdh1 são digeridas com enzimas de restrição EcoRI + XhoI e ligados em pGV1208KI, pGV1209KI e pGV1213KI digerido com BamHI (e, posteriormente, terminado às cegas com Klenow preenchido) + XhoI utilizando métodos padrão de biologia molecular (Sambrook, J. Fritsch, EF, Maniatis, T., 1989) para produzir pGV1208KIPflA, pGV1209KIPflB e pGV1213KIFdh1. Os plasmídeos resultantes, juntamente com pGV1227KI são transformados em uma espécie de *K. lactis* (MATa, pdc1, trp1, his3, leu2 ura3) e selecionado por prototrofia His, Leu, Trp e Ura. Transformantes de *Kluyveromyces lactis* abrigando pGV1428, pGV1429, pGV1430 e pGV1431 são utilizados como controle isolado. A produção de butanol é realizada conforme descrito no Exemplo 4. O rendimento esperado de n-butanol é superior a 10%.

Exemplo 31. (Profético). Expressão de Piruvato Formiato liase e Formate desidrogenase I em *Kluyveromyces lactis* carente de atividade de piruvato descarboxilase.

Clonagem de *E. coli* pflB (Piruvato Formiato liase inativo) e pflA (ativação enzimática de Piruvato Formiato liase) Cb-FDH1 são como descritos no Exemplo 30.

Os plasmídeos resultantes (pGV1428pflA, pGV1429pflB e pGV1430fdh1) e vetores (pGV1428, pGV1429 e pGV1430) são utilizados para transformar a espécie da levedura *K. lactis* (MatA, PDD, trp1, his3, leu2 e ura3) por métodos conhecidos (Kooistra R, Hooykaas PJ, Steensma HY. (2004) Yeast. 15, 21 (9) :781-92) para produzir PflA, PflB, Cb-Fdh1 expressando (PFL+) e controle de transformantes (PFL-). Ambos os conjuntos de transforman-

tes são escolhidos através de seleção por prototrofia HIS, TRP e LEU.

Os transformantes resultantes são avaliados para expressão PflA, PflB e Cb-Fdh1 utilizando extratos brutos de proteínas da levedura e por análise ocidental do borrão, tal como descrito no Exemplo 2.

5 Estes transformantes de leveduras verificados para expressar todas as três proteínas são avaliadas para níveis celulares de acetil-CoA, em comparação com os transformantes que controlam apenas vetores. Para isso, células PFL+ e PFL- são cultivadas em médio SC-LEU, HIS, TRP formato de frasco para agitação e avaliada conforme descrito no Exemplo 30.

10 Para avaliar o modo como a expressão de PflA, PflB e Fdh1 resulta em maior produção de butanol, pGV1208KIPflA, pGV1209KIPflB e pGV1213KIFdh1 juntamente com pGV1227KI são transformados em *K. lactis* (MAT uma, *pdc1Δ*, *trp1*, *his3*, *leu2*, *ura3*) e selecionados por prototrofia His, Leu, Trp e Ura. Transformantes *Kluyveromyces lactis* abrigando pGV1428, pGV1429, pGV1430 e pGV1431 são utilizados como controle isolado. A produção
15 de butanol é realizada conforme descrito no Exemplo 4. O rendimento esperado de n-butanol é superior a 50%.

Exemplo 32. (Profético). Expressão de PIF (Piruvato Formiato liase) e Fdh1 (Formate dehydrogenase I) em um *Kluyveromyces lactis* desprovido de atividade de Adh1.

20 Clonagem de *E. coli pflB* (Piruvato Formiato liase inativo), *pflA* (ativação enzimática Piruvato Formiato liase) e *Cb-FDH1* são descritas no Exemplo 30.

Os plasmídeos resultantes (pGV1428pflA, pGV1429pflB e pGV1430fdh1) e vetores (pGV1428, pGV1429 e pGV1430) são utilizados para transformar a espécie de levedura *K. lactis* (MAT uma, *trp1*, *his3*, *leu2*, *ura3*) por métodos conhecidos (Kooistra R, Hooykaas PJ, Steensma HY. (2004) Yeast. 15, 21 (9) :781-92) para rendimento PflA, PflB1 Fdh1 expres-
25 sando (EcPFL +) e controle de transformantes (EcPFL-). Ambos os conjuntos de transformantes são escolhidos através de seleção por prototrofia HIS, TRP e LEU.

Os transformantes resultantes são avaliados para expressão PflA, PflB e Fdh1 utilizando extrato bruto de proteínas da levedura e por análise ocidental de borrão, tal como descrito no Exemplo 2.

30 Estes transformantes de leveduras verificados para expressar todas as três proteínas são avaliados por níveis celulares de acetil-CoA, em comparação com os transformantes que controlam apenas vetores. Para isso, células EcPFL+ e EcPFL- são cultivadas em médio SC-LEU, SUA, TRP em formato de frasco agitação e avaliada conforme descrito no Exemplo 30.

35 Para avaliar o modo como a expressão de PflA, PflB e Fdh1 resulta em maior produção de butanol, pGV1208KIPflA, pGV1209KIPflB e pGV1213KIFdh1 juntamente com pGV1227KI são transformados em *K. lactis* (MATa, *adh1Δ*, *trp1*, *his3*, *leu2*, *ura3*) e selecio-

nados prototrofia His, Leu, Trp e Ura. Transformantes de *Kluyveromyces lactis* abrigando pGV1428, pGV1429, pGV1430 e pGV1431 são utilizados como controle isolado. A produção de butanol é realizada conforme descrito no Exemplo 4. O rendimento esperado de n-butanol é superior a 20%.

5 Exemplo 33. (Profético). Superexpressão de KIALD6 em *Kluyveromyces lactis*.

Para clonar *KIALD6*, o DNA genômico de *Kluyveromyces lactis* é utilizado como um modelo em uma reação de PCR com primers KIALD6_left5 e KIALD6_right3 (ver Tabela 1), que é montado, de qualquer forma, conforme descrito no Exemplo 5. Os primers amima-

10 resultantes da PCR são digeridos com SalI + BamHI e ligado de forma semelhante à restrição digerida pGV1428 para produzir pGV1428KIALD6. Posteriormente, *KIALD6* é subclonado pela digestão dos pGV1428ALD6 com EcoICRI + XhoI e ligação em BamHI (e, posteriormente, terminado às cegas por Klenow preenchido) + XhoI-digerida pGV1208KI para produzir pGV1208KIALD6.

15 O plasmídeo resultante, pGV1428ALD6KI, e vetor, pGV1428 são utilizados para transformar a espécie da levedura *K. lactis* (MATa, trp1, his3, leu2, ura3) por métodos conhecidos (R Kooistra, Hooykaas PJ, Steensma HY. (2004) Yeast. 15, 21 (9) :781-92) para produzir superexpressão KIALD6+ e KIALD6- e controle de transformantes, respectivamente. Ambos os conjuntos de transformantes são escolhidos através de seleção por prototrofia

20 HIS.

Os transformantes resultantes, KIALD6+ e-KIALD6 são avaliados para expressão KIALD6 utilizando extratos brutos de proteínas da levedura e por análise ocidental do borrão, tal como descrito no Exemplo 2.

25 Aqueles transformantes *K. lactis* verificados para superexpressar proteínas KIALD6 são avaliados para o aumento da atividade de acetaldeído desidrogenase, em comparação com transformantes que controlam apenas vetores. Para isso, células KIALD6+ e KIALD6- são cultivadas em médio SC - SUA em formato de frasco para agitação e avaliada conforme descrito no Exemplo 23.

30 Para avaliar a forma como a superexpressão de KIALD6 resulta em maior produção de butanol, pGV1208KIALD6 é transformado em *K. lactis* (MATa, trp1, his3, leu2, ura3), juntamente com pGV1209KI, pGV1227KI e pGV1213KI e selecionados por prototrofia His, LEU, TRP URA e transformantes decorrentes de *K. lactis* transformados com pGV1428, pGV1429, pGV1430 e pGV1431 são utilizados como controle isolado. A produção de butanol é realizada conforme descrito no Exemplo 4. O rendimento esperado de n-butanol é superior a 5%.

35

Exemplo 34. (Profético). Superexpressão de um aldeído desidrogenase em *Kluyveromyces lactis* desprovida de atividade Adh1.

Clonagem de gene *Kluyveromyces* KIALD6 é descrita no Exemplo 33.

O plasmídeo resultante, pGV1428ALD6, e o vetor, pGV1428 são utilizados para transformar a espécie de levedura *K. lactis* (MATa, adh1Δ, trp1, his3, leu2, ura3) por métodos conhecidos (R Kooistra, Hooykaas PJ, Steensma HY. (2004) Yeast. 15, 21 (9):781-92) para produzir superexpressão de KIALD6+ e KIALD6- e controle de transformantes, respectivamente. Ambos os conjuntos de transformantes são escolhidos através de seleção por prototrofia HIS.

Os transformantes resultantes - são avaliados pela expressão KIAld6 utilizando extratos brutos de proteínas da levedura e por análise ocidental de borrão, tal como descrito no Exemplo 2.

Aqueles transformantes *K. lactis* verificados para expressar proteínas KIAld6 são avaliados para o aumento da atividade de acetaldeído desidrogenase como descrito no Exemplo 30.

Para avaliar a forma como a superexpressão de KIAld6 resulta em maior produção de butanol, pGV1208KIALD6 é transformado em *K. lactis* (MATa, adh1Δ, trp1, his3, leu2, ura3), juntamente com pGV1209KI, pGV1227KI e pGV1213KI e selecionados por prototrofia His, LEU, TRP e URA. Transformantes decorrentes de *K. lactis* transformado com pGV1428, pGV1429, pGV1430 e pGV1431 são utilizados como controle isolado. Produção de butanol é realizada conforme descrito no Exemplo 4. O rendimento esperado de n-butanol é superior a 10%.

Exemplo 35. (Profético). Superexpressão de um gene acetil-CoA sintetase da levedura *Kluyveromyces lactis*.

Dois genes parálogos, *KIACS1* e *KIACS2*, codificam a atividade de acetil-CoA no genoma da levedura *Kluyveromyces lactis*. Para clonar *KIACS1* e *KIACS2*, o DNA genômico *Kluyveromyces lactis* é utilizado como modelo com primers *KIACS1_left5* & *KIACS2_Right3* (*ACS1*) e *KIACS2_Left5* & *KIACS2_Right3* (*ACS2*) (ver tabela 1), contendo locais de restrição NotI & Sall e Sall & BamHI nos primers diretos e reversos, respectivamente. Os fragmentos PCR resultantes são digerido com as enzimas apropriadas e ligado de forma semelhante restrição digerida pGV1429 e pGV1431 para render pGV1429ACS1 e pGV1431ACS2. Posteriormente, *KIACS1* e *KIACS2* são subclonados pela digestão dos pGV1429ACS1 e pGV1431 ACS2 com Sall & NotI e ligação de forma similar digerido pGV1209KI e pGV1213KI para produzir pGV1209KIACS1 e pGVKIACS2.

Os plasmídeos resultantes, pGV1429ACS1 e pGV1431ACS2 e vetores vazios pGV1429 e pGV1431 são utilizados para transformar *K. lactis* (MATa, trp1, his3, leu2, ura3) por métodos conhecidos para produzir proteínas *KIACS1+*, *KIACS2+* e *KIACS-* sobre-expressando transformantes de controle, respectivamente. Ambos os conjuntos de transformantes são escolhidos através de seleção por prototrofia TRP, URA. O transformantes

são avaliados para expressão KIAcs1 e KIAcs2 utilizando extratos brutos de proteínas da levedura e por análise ocidental de borrão, tal como descrito no Exemplo 2.

Estes transformantes de leveduras verificados para expressar proteínas KIAcs1 e KIAcs2 são avaliados para o aumento da atividade de acetil-CoA sintetase, em comparação com os transformantes que controlam apenas vetores. Para isso, células KIAcs1+, KIAcs2+ e KIAcs- são cultivadas em médio SC-TRP, URA em formato de frasco para agitação e avaliada conforme descrito no Exemplo 25.

Para avaliar a forma como a superexpressão de *KIACS1* e *KIACS2* resulta em maior produção de butanol, pGV1209KIACS1 e pGV1209KIACS2 transformam-se em espécie Gevo em 1287, juntamente com pGV1208KI e pGV1227KI, e as células transformadas são selecionadas por prototrofia His, Leu, Trp e Ura. Transformantes resultantes de um *K. lactis* (MATa, trp1, his3, leu2, ura3) transformada com pGV1428, pGV1429, pGV1430 e pGV1431 são utilizados como controle isolado. A produção de butanol é realizada conforme descrito no Exemplo 4. O rendimento esperado de n-butanol é superior a 5%.

Exemplo 36. (Profético). Superexpressão de um gene acetil-CoA sintetase em uma levedura *Kluyveromyces lactis* desprovida de atividade Adh1.

Clonagem de genes *KIACS1* e *KIACS2* de *Kluyveromyces lactis* é descrito no Exemplo 35.

Os plasmídeos resultantes, pGV1429ACS1 e pGV1431ACS2 e vetores vazios pGV1429 e pGV1431 são utilizados para transformar *K. lactis* (MATa, adh1Δ, trp1, his3, leu2, ura3) por métodos conhecidos para produzir superexpressão *KIACS1+* e *KIACS2+* e transformantes de controle, respectivamente. Ambos os conjuntos de transformantes são escolhidos através de seleção por prototrofia TRP e URA. Os transformantes são avaliados para KIAcs1 e expressão KIAcs2 utilizando extratos brutos de proteínas da levedura e por análise ocidental de borrão, tal como descrito no Exemplo 2.

Estes transformantes de leveduras verificados para expressar proteínas KIAcs1 e KIAcs2 são avaliados para o aumento da atividade de acetil-CoA sintetase descrita no Exemplo 25.

Para avaliar a forma como a sobre-expressão de *KIACS1* e *KIACS2* resulta em maior produção de butanol, pGV1209KIACS1 e pGV1209KIACS2 são transformados em *K. lactis* (MatA, adh1, trp1, his3, leu2 e ura3), juntamente com pGV1208KI e pGV1227KI. A produção de butanol é realizada conforme descrito no Exemplo 4. O rendimento esperado de n-butanol é superior a 10%.

Exemplo 37. (Profética). KIALD6 e KIAcs1 ou KIAcs2 sobre-expressão em *Kluyveromyces lactis*.

Os genes *KIALD6*, *KIACS1* e *KIACS2* são clonados como descrito acima, nos exemplos 33 e 35.

Os plasmídeos resultantes pGV1428ALD6 e pGV1429ACS1 ou pGV1430ACS2 e vetores pGV1428 e pGV1429 ou pGV1430 são utilizados para transformar *K. lactis* (MATa, trp1, his3, leu2, ura3) por métodos conhecidos para produzir superexpressão de KIALD6+ KIACS1+, KIALD6+ e KIACS2+ e KIALD-KIACS-, e transformantes de controle, respectivamente. Ambos os conjuntos de transformantes são escolhidos através de seleção por prototrofia His, TRP, LEU, respectivamente.

Os transformantes KIALD6+KIACS1+ e KIALD6+KIACS2 são avaliados para o aumento da atividade de acetil-CoA sintetase, em comparação com os transformantes que controlam apenas vetores (ALD-ACS-). Para isso, células KIALD6+KIACS1, KIALD6+KIACS2+ e KIALD-KIACS- são cultivadas em meios SC - HIS, TRP HIS1LEU, respectivamente, em formato de frasco para agitação e avaliada conforme descrito no Exemplo 25.

Para avaliar a forma como a superexpressão de KIAld6 e KIAcs1 ou KIAcs2 resulta em maior produção de butanol, *K. lactis* (MATa, trp1, his3, leu2 ura3) é transformada com pGV1208KIALD6, pGV1209KIACS1 ou pGV1209KIACS2, pGV1227KI, pGV1213KI e selecionadas por prototrofia HIS, LEU, TRP e URA. Os transformantes resultantes de *K. lactis* (MATa, trp1, his3, leu2 ura3) transformados com pGV1428, pGV1429, pGV1430 e pGV1431 são utilizados como controle isolado. A produção de butanol é realizada conforme descrito no Exemplo 4. O rendimento esperado de n-butanol é superior a 5%.

Exemplo 38. (Profético). Superexpressão de *KIALD6*, *KIACS1* e *KIACS2* em *Kluyveromyces lactis* desprovida de atividade de KIAdh1 (KladhΔ).

Os genes KIALD6, KIACS1 e KIACS2 são clonados como descrito nos exemplos 33 e 35.

Os plasmídios resultantes de pGV1428ALD6 e pGV1429ACS1 ou pGV1430ACS2 e vetores pGV1428 e pGV1429 ou pGV1430 são utilizados para transformar *K. lactis* (MATa, Kladh1Δ trp1, his3, leu2 ura3) por métodos conhecidos para produzir superexpressão de KIALD6+KIACS1+, KIALD6+KIACS2+ e KIALD-KIACS-, e transformantes de controle, respectivamente. Ambos os conjuntos de transformantes são escolhidos através de seleção de por HIS, e prototrofia SUA TRP, LEU, respectivamente.

Os transformantes, KIALD6+KIACS1+ e KIALD6+KIACS2+ são avaliados por níveis celulares de acetil CoA conforme descrito no Exemplo 14.

Para avaliar se a superexpressão de KIAld6 e KIAcs1 ou KIAcs2 resulta ou não em maior produção de butanol, *K. lactis* (MATa, Kladh1Δtrp1, his3, leu2 ura3) é transformada com pGV1208KIALD6, pGV1209KIACS1 ou pGV1209KIACS2, pGV1227KI, pGV1213KI. A produção de butanol é realizada conforme descrito no Exemplo 4. O rendimento esperado de n-butanol é superior a 10%.

REIVINDICAÇÕES

1. Levedura metabolicamente projetada capaz de metabolizar a fonte de carbono a fim de produzir n-butanol, **CARACTERIZADA** pelo fato de que pelo menos um percurso configurado para produzir uma quantidade elevada de acetil-CoA citosólico relativo à outra
5 quantidade de acetil-CoA citosólico produzido por levedura do tipo selvagem, e pelo menos um gene anormal para codificar e expressar pelo menos uma enzima para um percurso metabólico capaz de utilizar NADH para converter acetil-CoA em n-butanol.

2. Levedura, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que pelo menos um gene anormal sozinho codifica e expressa pelo menos uma enzima para o
10 percurso metabólico capaz de utilizar NADH para converter acetil-CoA em n-butanol.

3. Levedura, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que pelo menos um gene anormal em combinação com pelo menos um gene de levedura nativa codifica e expressa pelo menos uma enzima para o percurso metabólico capaz de utilizar NADH para converter acetil-CoA em n-butanol.

4. Levedura, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a levedura superexpressa piruvato descarboxilase para elevar a produção de acetil-CoA citosólico.

5. Levedura, de acordo com a reivindicação 4, **CARACTERIZADA** pelo fato de que piruvato descarboxilase é codificada pelo gene PDC1 de *S. cerevisiae*.

6. Levedura, de acordo com a reivindicação 4, **CARACTERIZADA** pelo fato de que piruvato descarboxilase é codificado por pelo menos um dos genes PDC1, PDC5 e PDC6 de *S. cerevisiae*.

7. Levedura, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a levedura superexpressa um aldeído desidrogenase para elevar a produção de acetil-CoA
25 citosólico.

8. Levedura, de acordo com a reivindicação 7, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o aldeído desidrogenase é codificado pelo gene ALD6 de *S. cerevisiae*.

9. Levedura, de acordo com a reivindicação 7, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o aldeído desidrogenase é codificado pelo gene ALD6 de *K. lactis*.

10. Levedura, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a levedura superexpressa acetil-CoA sintetase para elevar a produção de acetil-CoA citosólico.

11. Levedura, de acordo com a reivindicação 10, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a acetil-CoA sintetase é codificado por pelo menos um dos genes *ACS1* de *S. cerevisiae* e *S. cerevisiae* *ACS2*.

12. Levedura, de acordo com a reivindicação 10, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a acetil-CoA sintetase é codificado por pelo menos um dos genes *ACS1* de *K. lactis* e

ACS2 de *K. lactis*.

13. Levedura, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que a levedura superexpressa ambas desidrogenase de aldeído e sintetase de acetil-CoA para elevar a produção de acetil-CoA citosólico.

5 14. Levedura, de acordo com a reivindicação 13, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que o aldeído desidrogenase é codificado por gene ALD6 de *S. cerevisiae* e o acetil-CoA sintetase é codificado por pelo menos um dos genes ACS1 de *S. cerevisiae* e ACS2 de *S. cerevisiae*.

10 15. Levedura, de acordo com a reivindicação 13, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que o aldeído desidrogenase é codificado por gene ALD6 de *K. lactis* e o acetil-CoA sintetase é codificado por pelo menos um dos genes ACS1 de *K. lactis* e ACS2 de *K. lactis*.

16. Levedura, de acordo com a reivindicação 13, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que a levedura superexpressa piruvato descarboxilase para elevar a produção de acetil-CoA citosólico

15 17. Levedura, de acordo com a reivindicação 16, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que a piruvato descarboxilase é codificada por pelo menos um de PDC1, PDC5 e PDC6, o aldeído desidrogenase é codificado pelo gene ALD6 de *S. cerevisiae* e acetil-CoA sintetase é codificado por pelo menos um dos genes ACS1 de *S. cerevisiae* e ACS2 de *S. cerevisiae*.

20 18. Levedura, de acordo com a reivindicação 16, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que a descarboxilase de piruvato é codificada por *K. lactis* PDC1, o aldeído desidrogenase é codificado pelo gene *K. lactis* ALD6 e a sintetase de acetil-CoA é codificada por pelo um dos genes *K. lactis* ACS1 e *K. lactis* ACS2.

25 19. Levedura, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que a levedura superexpressa desidrogenase de piruvato para elevar a produção de acetil-CoA citosólico.

20. Levedura, de acordo com a reivindicação 19, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que a levedura superexpressa desidrogenase de piruvato codificada pelos genes *E. coli* aceE, aceF, lpdA elevar a produção de acetil-CoA citosólico.

30 21. Levedura, de acordo com a reivindicação 20, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que a atividade PDC é reduzida ou eliminada.

22. Levedura, de acordo com a reivindicação 19, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que a levedura superexpressa desidrogenase de piruvato codificada pelos genes *S. cerevisiae* PDA1, PDB1, PDX1, LAT1, LPD1 com sinal de segmentação mitocondrial N-terminal suprimido de forma a elevar a produção de acetil-CoA citosólico.

35 23. Levedura, de acordo com a reivindicação 22, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que a atividade PDC é reduzida ou eliminada.

24. Levedura, de acordo com a reivindicação 23, **CHARACTERIZADA** pelo fato de

que a levedura de *S. cerevisiae* é do (1) genótipo *pdv2* $\diamond$ ou (2) genótipo *pdv1* $\diamond$, genótipo *pdv5* $\diamond$ e genótipo *pdv6* $\diamond$.

25. Levedura, de acordo com a reivindicação 23, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que a levedura *K. lactis* é do genótipo *pdv1* $\diamond$.

5 26. Levedura, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que a levedura superexpressa ambas piruvato formiato liase e formiato desidrogenase para elevar a produção de acetil-CoA citosólico.

27. Levedura, de acordo com a reivindicação 26, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que a levedura superexpressa piruvato formiato liase codificado pelos genes *E. coli* *pfiA* e *E. coli* *pfiB* e em combinação com o gene *C. boidini* *FDH1* de forma a elevar a produção de acetil-CoA citosólico.

28. Levedura, de acordo com a reivindicação 27, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que a atividade PDC é reduzida ou eliminada.

29. Levedura, de acordo com a reivindicação 27, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que a levedura é *S. cerevisiae* do (1) genótipo *pdv2* $\diamond$ ou (2) genótipo *pdv1* $\diamond$, genótipo *pdv5* $\diamond$ e genótipo *pdv6* $\diamond$.

30. Levedura, de acordo com a reivindicação 27, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que a levedura é *K. lactis* do genótipo *pdv1* $\diamond$.

31. Levedura, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que pelo menos um gene anormal foi submetido a evolução molecular para melhorar a atividade enzimática da proteína assim codificada.

32. Levedura, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que pelo menos um álcool desidrogenase codificado por gene adicional é desativado de forma que a atividade do álcool desidrogenase é reduzido o suficiente para elevar a produção de acetil-CoA citosólico relativo à produção do tipo selvagem.

33. Levedura, de acordo com a reivindicação 32, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que a levedura é *S. cerevisiae* e o álcool desidrogenase é codificado por *ADH1*.

34. Levedura, de acordo com a reivindicação 32, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a levedura é *K. lactis* e o álcool desidrogenase é codificado por *ADH1*.

30 35. Levedura, de acordo com a reivindicação 32, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que a levedura é *S. cerevisiae* e o álcool desidrogenase é codificado por *ADH1*, *ADH2*, *ADH3* e *ADH4*.

36. Levedura, de acordo com a reivindicação 32, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que a levedura é *K. lactis* e o álcool desidrogenase é codificado por *ADH1*, *ADH2*, *ADH3* e *ADH4*.

37. Levedura, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que a levedura é uma espécie de um dos gêneros *Saccharomyces*, *Dekera*, *Pichia*, *Hanse-*

nula, Yarrowia, Aspergillus, Kluyveromyces, Pachysolen, Schizosaccharomyces, Candida, Trichosporon, Yamadezyma, Toluraspora e Cryptococcus.

38. Levedura, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o percurso fornece produção e consumo de NADH balanceados quando metabolizando fonte de carbono para produzir n-butanol.

39. Método de produzir n-butanol, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

(a) fornecimento de levedura metabolicamente projetada capaz de metabolizar fonte de carbono a fim de produzir n-butanol, pelo menos um percurso configurado para produzir uma quantidade elevada de acetil-CoA citosólico relativo a outra quantidade de acetil-CoA citosólico produzido por levedura do tipo selvagem, e pelo menos um gene anormal para codificar e expressar pelo menos uma enzima para um percurso metabólico capaz de utilizar NADH para converter acetil-CoA em n-butanol.

(b) cultura de levedura metabolicamente projetada por determinado período de tempo e sob condições de produzir n-butanol.

40. Método de produzir n-butanol utilizando levedura, que compreende:

(a) Projeção metabólica de levedura para elevar produção de acetil-CoA citosólico.

(b) Projeção metabólica de levedura para expressar percurso metabólico que converta fonte de carbono em n-butanol, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o percurso exige pelo menos uma enzima nativa da levedura, onde as etapas (a) e (b) podem ser executadas em qualquer ordem; e

(c) cultura de levedura por determinado período de tempo e sob condições de produzir quantidade recuperável de n-butanol

41. Método de produzir n-butanol utilizando levedura, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

(a) cultura de levedura metabolicamente projetada por determinado período de tempo e sob condições de produzir biomassa de células de levedura sem ativar a produção de n-butanol; e

(b) alteração das condições de cultura por determinado período de tempo e sob condições de produzir quantidade recuperável de n-butanol.

42. Levedura metabolicamente projetada, **CARACTERIZADA** pelo fato de ser capaz de metabolizar fonte de carbono e produzir quantidade elevada de acetil-CoA relativo à quantidade de acetil-CoA citosólico produzido por levedura tipo selvagem.

43. Levedura, de acordo com a reivindicação 42, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a levedura superexpressa piruvato descarboxilase, aldeído desidrogenase e acetil-CoA sintetase para elevar a produção de acetil-CoA citosólico.

44. Levedura, de acordo com a reivindicação 42, **CARACTERIZADA** pelo fato de

que o piruvato descarboxilase é codificado por pelo menos um gene *S. cerevisiae* PDC1, PDC5 e PDC6, o aldeído desidrogenase é codificado por *S. cerevisiae* ALD6 e o acetil-CoA sintetase é codificado por pelo menos um dos genes *S. cerevisiae* ACS1 e *S. cerevisiae* ACS2.

5 45. Levedura, de acordo com a reivindicação 44, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que o álcool desidrogenase é desativado pela eliminação do gene *S. cerevisiae* ADH1.

46. Levedura, de acordo com a reivindicação 42, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que a levedura é do gênero *Kluyveromyces*, a piruvato descarboxilase é codificada pelo gene *K. lactis* KIPDC1, o aldeído desidrogenase é codificado pelo gene *K. lactis* KIA LD6 e a acetil-CoA sintetase é codificado por pelo menos um dos genes *K. lactis* KIA CS1 e KIA CS2.

10 47. Levedura, de acordo com a reivindicação 46, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que o álcool desidrogenase é desativado pela eliminação do gene *K. lactis* ADH1.

48. Levedura, de acordo com a reivindicação 42, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que a levedura superexpressa piruvato desidrogenase para elevar a produção de acetil-CoA citosólico.

49. Levedura, de acordo com a reivindicação 48, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que a levedura superexpressa piruvato desidrogenase codificada por gene *E. coli* aceE, gene *E. coli* aceF, gene *E. coli* lpdA de forma a elevar a produção de acetil-CoA citosólico.

20 50. Levedura, de acordo com a reivindicação 49, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que a atividade PDC é reduzida ou eliminada.

51. Levedura, de acordo com a reivindicação 49, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que a levedura é *S. cerevisiae* do (1) genótipo *pd c2* $\diamond$ ou (2) genótipo *pd c1* $\diamond$, genótipo *pd c5* $\diamond$ e genótipo *pd c6* $\diamond$.

25 52. Levedura, de acordo com a reivindicação 49, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que a levedura é *K. lactis* do genótipo *pd c1* $\diamond$.

53. Levedura, de acordo com a reivindicação 48, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que a levedura superexpressa piruvato desidrogenase codificada pelos genes *S. cerevisiae* PDA1, PDB1, PDX1, LAT1, LPD1 com sinal de segmentação mitocondrial N-terminal suprimido de forma a elevar a produção de acetil-CoA citosólico.

30 54. Levedura, de acordo com a reivindicação 53, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que a atividade PDC é reduzida ou eliminada.

55. Levedura, de acordo com a reivindicação 53, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que a levedura é *S. cerevisiae* do (1) genótipo *pd c2* $\diamond$ ou (2) genótipo *pd c1* $\diamond$, genótipo *pd c5* $\diamond$ e genótipo *pd c6* $\diamond$.

35 56. Levedura, de acordo com a reivindicação 53, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que a levedura é *K. lactis* do genótipo *pd c1* $\diamond$.

57. Levedura, de acordo com a reivindicação 42, **CHARACTERIZADA** pelo fato de

que a levedura superexpressa ambas piruvato formiato liase e formiato desidrogenase de forma a elevar a produção de acetil-CoA citosólico.

58. Levedura, de acordo com a reivindicação 57, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que a levedura superexpressa piruvato formiato liase codificada pelos genes E. coli pfiA, pfiB e em combinação com o gene C. boidini FDH1 de forma a elevar a produção de acetil-CoA citosólico.

59. Levedura, de acordo com a reivindicação 58, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que a atividade PDC é reduzida ou eliminada.

60. Levedura, de acordo com a reivindicação 59, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que a levedura é *S. cerevisiae* do (1) genótipo pdc2 $\diamond$ ou (2) genótipo pdc1 $\diamond$, genótipo pdc5 $\diamond$ e genótipo pdc6 $\diamond$.

61. Levedura, de acordo com a reivindicação 59, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que a levedura é *K. lactis* do genótipo pdc1 $\diamond$.

62. Levedura, de acordo com a reivindicação 42, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que pelo menos um gene foi submetido à evolução molecular para melhorar a atividade enzimática de uma proteína assim codificada.

63. Método de elevar a atividade metabólica da levedura, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que compreende produzir quantidade elevada de acetil-CoA citosólico da levedura relativa à outra quantidade de acetil-CoA citosólico produzido por levedura tipo selvagem.

64. Levedura metabolicamente projetada, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que tendo pelo menos um percurso configurado para produzir quantidade elevada de acetil-CoA citosólico relativa à outra quantidade de acetil-CoA citosólico produzido por levedura tipo selvagem

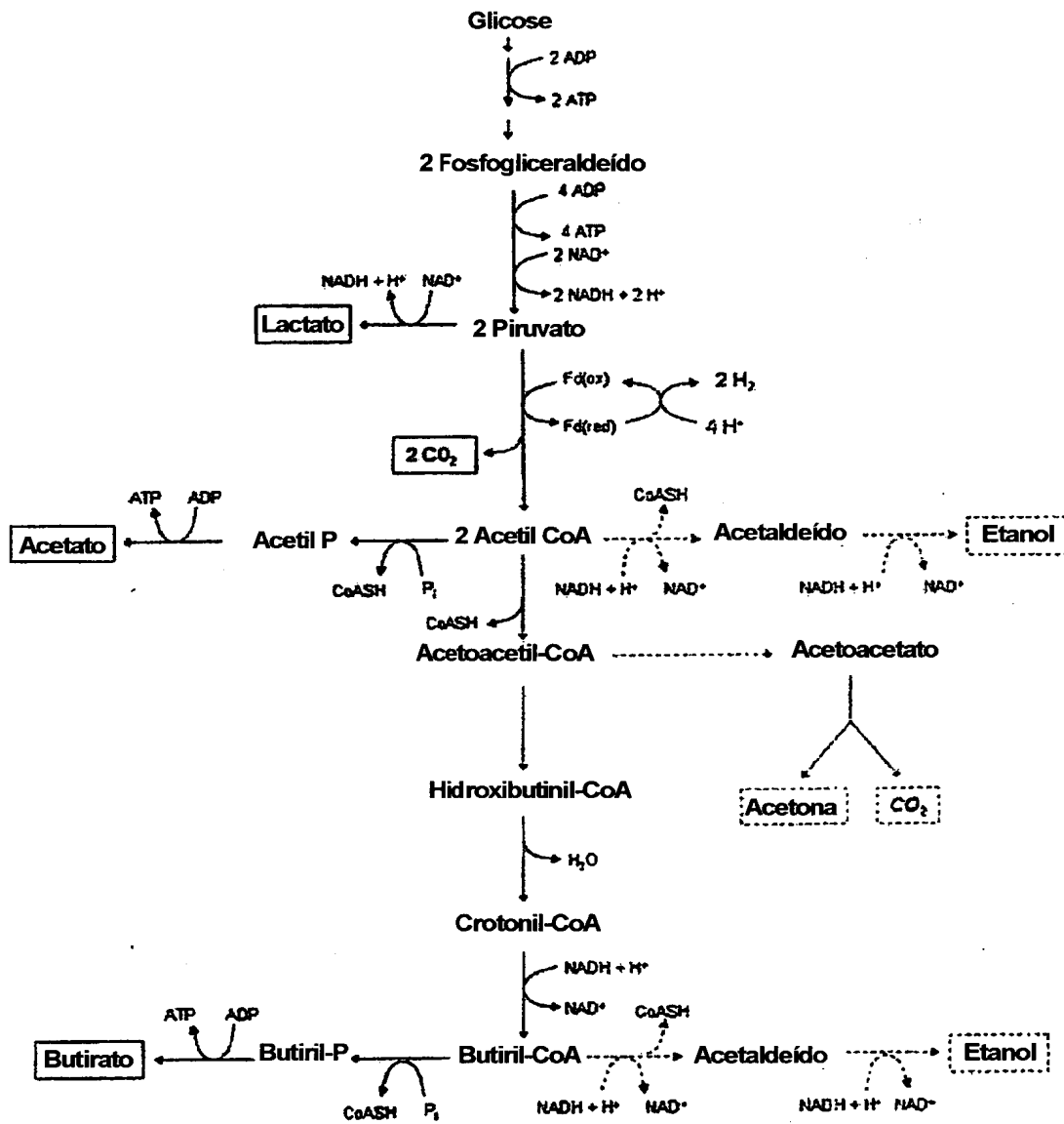


Fig. 1

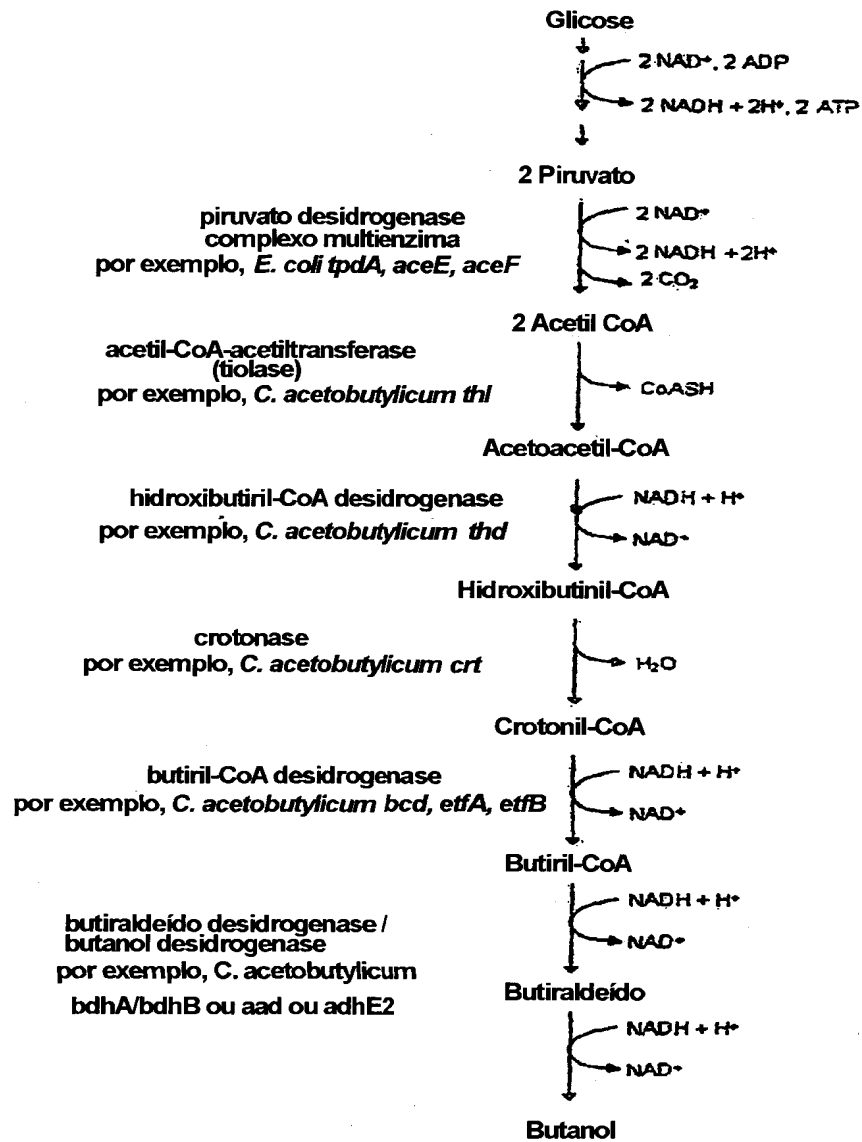
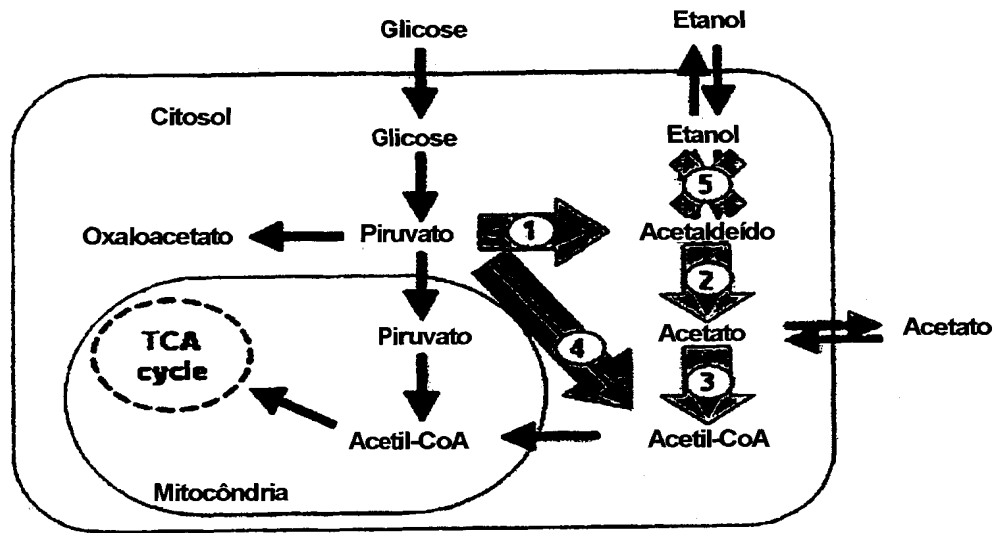


Fig. 2

**Fig. 3**

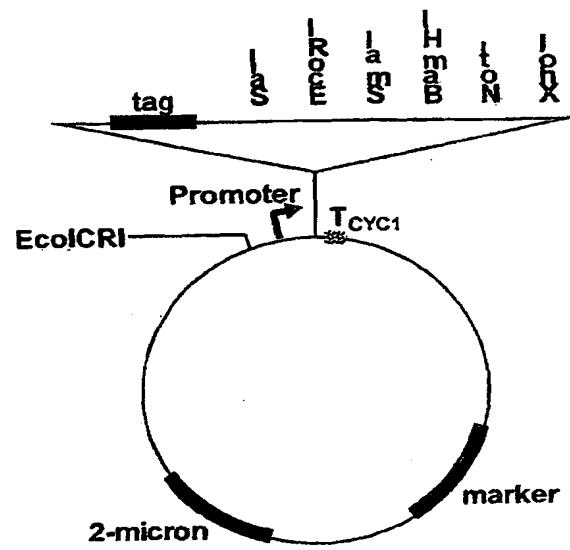


Fig. 4

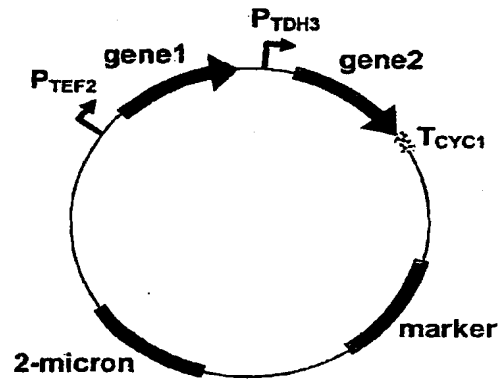


Fig. 5

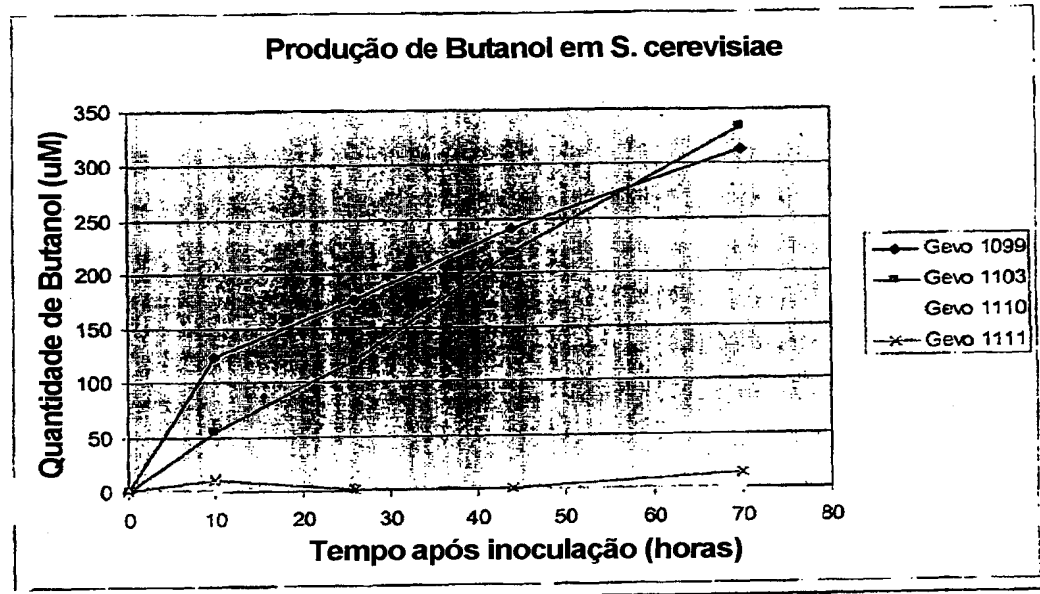


Fig. 6

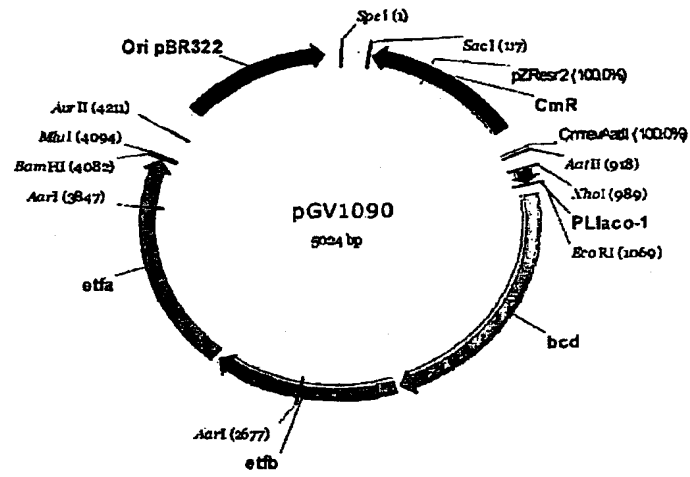


Fig. 7

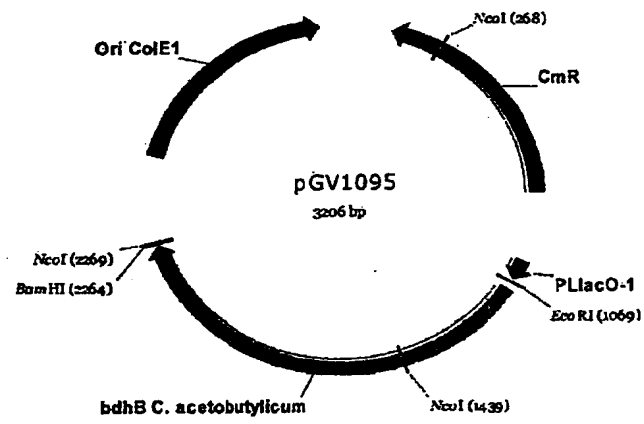


Fig. 8

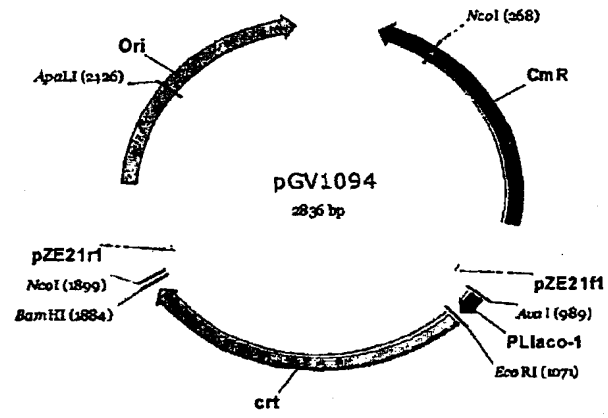


Fig. 9

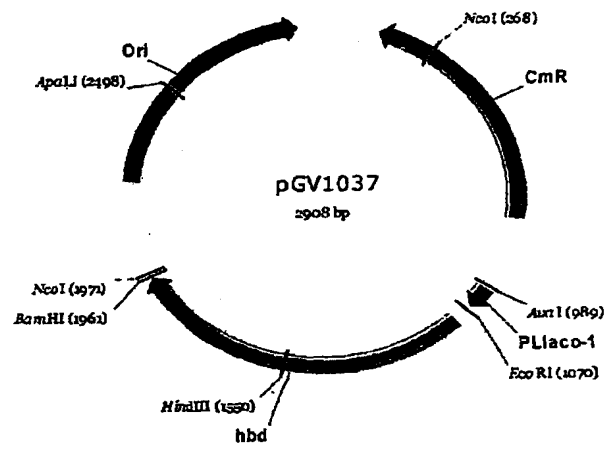


Fig. 10

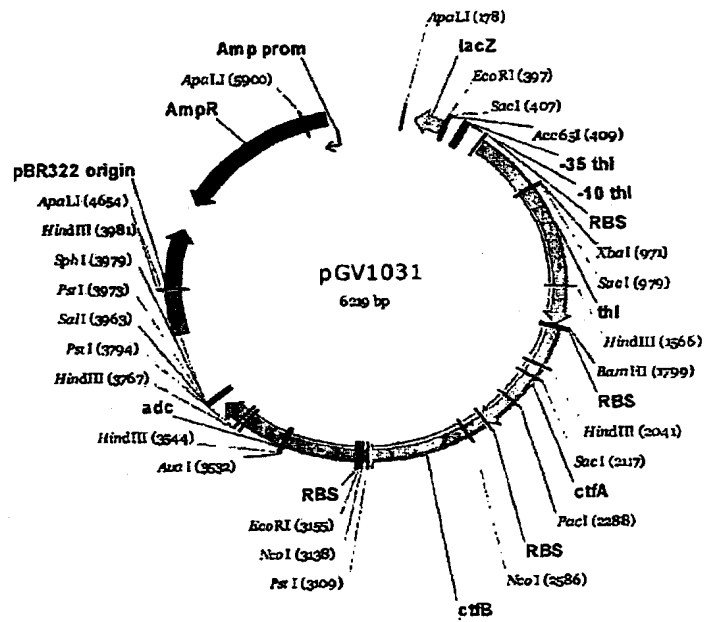


Fig. 11

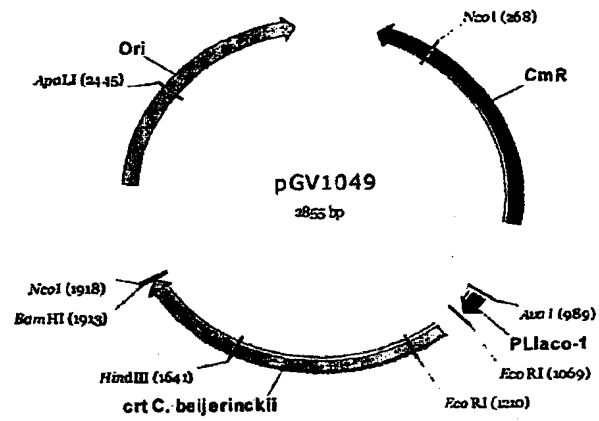


Fig. 12

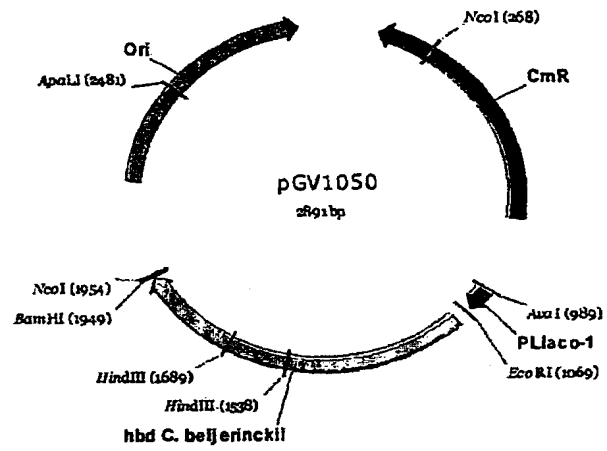


Fig. 13

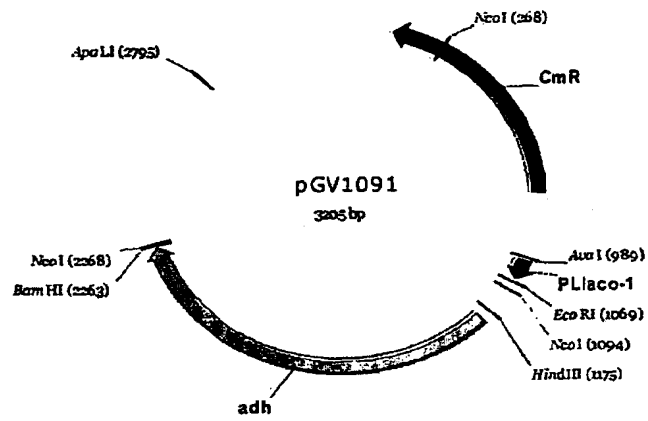


Fig. 14

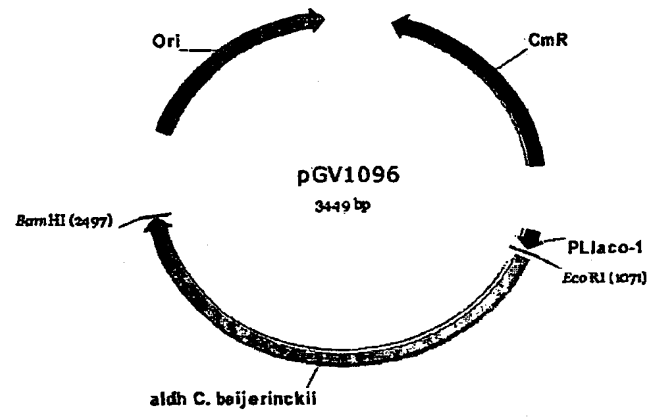


Fig. 15

RESUMO

“PRODUÇÃO DE BUTANOL ATRAVÉS DE LEVEDURA METABOLICAMENTE PROJETADA”

Existem descritos levedura metabolicamente projetada e métodos de produção de n-butanol. Em uma modalidade, a levedura metabolicamente projetada é capaz de metabolizar uma fonte de carbono para produzir n-butanol, pelo menos uma série de reações químicas produz acetil-CoA citosólica elevada em relação à acetil-CoA citosólica produzida por uma levedura tipo selvagem, e pelo menos um gene anormal codifica e expressa, pelo menos, uma enzima de um percurso metabólico capaz de utilizar NADH para converter acetil-CoA a n-butanol. Em outra modalidade, um método de produção de n-butanol inclui (a) prover levedura metabolicamente projetada capaz de metabolizar uma fonte de carbono para produzir n-butanol, pelo menos uma série de reações químicas produz acetil-CoA citosólica elevada em relação à acetil-CoA citosólica produzida por uma levedura tipo selvagem, e pelo menos um gene anormal codifica e expressa pelo menos uma das enzimas metabólicas para uma série de reações químicas utilizando NADH para converter acetil-CoA a n-butanol; e (b) cultivo da levedura para produzi n-butanol. Outras modalidades também são descritas.