



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

(21) **PI0618074-4 A2**

(22) Data de Depósito: 31/10/2006
(43) Data da Publicação: 16/08/2011
(RPI 2119)



* B R P I O 6 1 8 0 7 4 A 2 *

(51) *Int.Cl.:*
C12P 7/06 2006.01

(54) Título: **ORGANISMOS TERMOFÍLICOS PARA CONVERSÃO DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA EM ETANOL**

(30) Prioridade Unionista: 31/10/2005 US 60/731,674, 01/05/2006 US 60/796,380, 01/05/2006 US 60/796,380, 31/10/2005 US 60/731,674

(73) Titular(es): The Trustees Of Dartmouth College

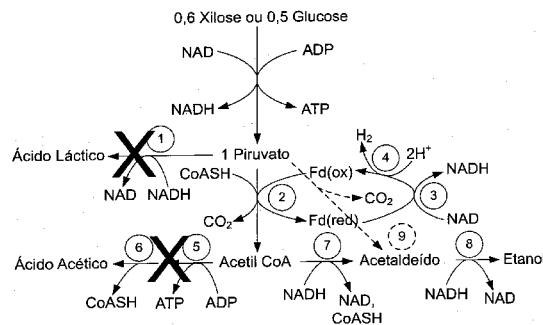
(72) Inventor(es): Arthur Josephus Shaw IV, Lee R. Lynd, Mikhail V. Tyurin, Sunil G. Desai

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

(86) Pedido Internacional: PCT US2006042442 de 31/10/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/053600 de 10/05/2007

(57) **Resumo:** ORGANISMOS TERMOFÍLICOS PARA CONVERSÃO DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA EM ETANOL. A presente invenção refere-se a organismos termofílicos mutantes que consomem uma variedade de substratos derivados de biomassa. São descritas aqui, cepas de *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* com expressão eliminada de fosfotransacetilase e acetato quinase. Adicionalmente, a cepa ALK1 foi produzida por recombinação homóloga sitio-dirigida para arrasar tanto a produção de ácido acético quanto a de ácido láctico. Cultura contínua envolvendo um estímulo da concentração de substrato leva a evolução de ALK1, e a formação de uma cepa mais robusta designada ALK2. Ambos os organismos produzem rendimentos de etanol quase teóricos sem expressar piruvato decarboxilase.



1. Lactato desidrogenase
2. Piruvato-ferredoxina oxidorreductase
3. NADH-ferredoxina oxidorreductase
4. Hidrogenase
5. Fosfotransacetilase
6. Acetato quinase
7. Acetaldeído desidrogenase
8. Álcool desidrogenase
9. Piruvato decarboxilase (NÃO PRESENTE)



PI0618074-4

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "ORGANISMOS TERMOFÍLICOS PARA CONVERSÃO DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA EM ETANOL".

Requerimentos Relacionados

- 5 Este requerimento reivindica prioridade para o Requerimento de Patente U.S. Nº 60/731.674, arquivado em 31 de outubro de 2005, e para o Requerimento de Patente U.S. Nº 60/796.380, arquivado em 1 de maio de 2006, cada um dos quais é incorporado aqui, por meio de referência.

Interesses do Governo

- 10 O Governo dos Estados Unidos podem ter certos direitos na presente invenção uma vez que pesquisa relevante para seu desenvolvimento foi financiada pelo National Institute of Standards and Technology sob o número de contrato 60NANB1D0064.

Antecedentes

15 1. Campo da Invenção

- A presente invenção pertence ao campo de processamento de biomassa para produzir etanol. Em particular, são descritos novos organismos termofílicos que consomem uma variedade de substratos derivados de biomassa e produzem etanol em alto rendimento, bem como processos para a produção e uso dos organismos.

2. Descrição da Técnica Relacionada

- 25 Biomassa representa um substrato celulolítico econômico e prontamente disponível a partir do qual podem ser produzidos açúcares. Estes açúcares podem ser usados sozinhos ou fermentados para produzir álcoois e outros produtos. Entre os produtos de bioconversão, o interesse no etanol é elevado porque este pode ser usado como um combustível doméstico renovável.

- 30 Importante pesquisa tem sido realizada nas áreas de design de reator, protocolos de pré-tratamento e tecnologias de separação, de modo que os processos de bioconversão estão se tornando economicamente competitivos com as tecnologias de combustíveis de petróleo. No entanto, estima-se que podem ser obtidas as maiores economias de custo quando

são combinadas duas ou mais etapas do processo. Por exemplo, processos simultâneos de sacarificação e fermentação (SSF) e simultâneos de sacarificação e co-fermentação (SSCF) combinam uma etapa de sacarificação enzimática com fermentação em um único reator ou equipamento de processo contínuo. Além da economia associada com tempos de reação mais curtos e reduzidos custos de capital, os processos de co-fermentação também podem proporcionar aprimoradas produções de produtos porque alguns compostos que de outro modo se acumulariam em níveis que inibem metabólise ou hidrólise são consumidos pelos organismos de co-fermentação. Em um exemplo similar, a β -glucosidase pára de hidrolisar celobiose na presença de glicose e, por sua vez, o desenvolvimento de celobiose impede a degradação da celulose. Um processo de SSCF envolvendo co-fermentação de celulose e produtos da hidrólise da hemicelulose podem aliviar este problema convertendo glicose em um ou mais produtos que não inibem a atividade hidrolítica da β -glucosidase.

O bioprocessamento consolidado (CBP) envolve quatro eventos mediados biologicamente: (1) produção de enzimas, (2) hidrólise de substrato, (3) fermentação de hexose e (4) fermentação de pentose. Estes eventos podem ser realizados em uma única etapa. Esta estratégia requer um microorganismo que utiliza celulose e hemicelulose. O desenvolvimento de organismos de CBP potencialmente pode resultar em reduções de custo muito grandes comparado com a abordagem mais convencional para produzir enzimas sacarolíticas em uma etapa de processo dedicada. Os processos de CBP que utilizam mais de organismo para realizar os quatro eventos mediados biologicamente são referidos como fermentações de co-cultura por bioprocessamento consolidado.

Algumas bactérias têm a capacidade de converter açúcares de pentose em açúcares de hexose, e de fermentar os açúcares de hexose em uma mistura de ácidos orgânicos e outros produtos por glicólise. O caminho glicolítico inicia com conversão de uma moléculas de glicose de seis carbonos em duas molécula de piruvato de três carbonos. Piruvato pode ser então convertido em lactato pela ação de lactato deidrogenase ("*ldh*"), ou em acetil

coenzima A ("acetil-CoA") pela ação de piruvato desidrogenase ou piruvato-ferredoxina oxidoredutase. Acetil-CoA é adicionalmente convertida em acetato por fosfotransacetilase e acetato quinase, ou reduzida para etanol por acetaldeído desidrogenase ("AcDH") e álcool desidrogenase ("*adh*").

Especialmente, o desempenho de organismos produtores de etanol é comprometido pela produção de produtos orgânicos diferentes de etanol, e particularmente por conversão de piruvato em lactato mediada por *ldh*, e por conversão de acetil-CoA em acetato por fosfotransacetilase e acetato quinase.

A engenharia metabólica de bactérias recentemente resultou na criação de um nocaute de lactato desidrogenase na bactéria Gram-positiva termofílica, anaeróbica *T. saccharolyticum*. Vide, Desai, S.G.; Guerinot, M.L.; Lynd, L.R. "Cloning of L-lactate dehydrogenase and elimination of lactic acid production via gene knockout in *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* JW/SL-YS485" Appl. Microbiol. Biotechnol. **65**: 600-605, 2004.

Embora o nocaute de *ldh* constitua um avanço na técnica, é problemático para alguns usos deste organismo em que esta cepa de *T. saccharolyticum* continua a produzir ácido orgânico – em particular, ácido acético.

Sumário

Os presentes meios representam um avanço na técnica e superaram os problemas descritos acima em linhas gerais, proporcionando bactérias termofílicas, anaeróbicas que consomem uma variedade de substratos derivados de biomassa e produzem etanol em produções quase teóricas. Também são descritos métodos para produzir etanol usando os organismos.

Os meios reportados aqui, resultam no nocaute de vários genes ou unicamente ou em combinação, onde os referidos genes no organismo nativo resultariam de modo diverso na formação de ácidos orgânicos. Por exemplo, pode haver nocautes de: (a) acetato quinase e/ou fosfotransacetilase e (b) lactato desidrogenase (*ldh*), acetato quinase (*ack*) e fosfotransacetilase (*pta*) em *T. saccharolyticum* JW/SL-YS485. Embora os resultados reportados aqui, sejam para *T. saccharolyticum*, os métodos e materiais também se aplicam a outros membros do gênero *Thermoanaerobacter* incluindo *Thermoa-*

naerobacterium thermosulfurigenes, *Thermoanaerobacterium aotearoense*, *Thermoanaerobacterium polysaccharolyticum*, *Thermoanaerobacterium zeae*, *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, e *Thermoanaerobacterium xylanolyticum*. Os métodos e materiais são úteis de modo geral no campo de bactérias Gram-positivas termofílicas produzidas metabolicamente.

Em uma modalidade, um organismo isolado, o qual não expressa piruvato decarboxilase, fermenta um substrato celulolítico para produzir etanol em uma concentração que é no mínimo 90% de uma produção teórica.

Em uma modalidade, uma bactéria Gram-positiva, que em um estado nativo contém no mínimo um gene o qual confere à bactéria Gram-positiva a capacidade de produzir ácido acético como um produto de fermentação, é transformado para eliminar a expressão do no mínimo um gene. A bactéria pode ser um *Thermoanaerobacter*, tal como *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*. O gene o qual confere à bactéria Gram-positiva uma capacidade de produzir ácido acético como um produto de fermentação pode codificar para expressão de acetato quinase e/ou fosfotransacetilase.

Em outra modalidade, a bactéria Gram-positiva pode ser adicionalmente transformada para eliminar a expressão de um ou mais genes que conferem à bactéria Gram-positiva a habilidade de produzir ácido láctico como um produto de fermentação. Por exemplo, o gene que confere a capacidade de produzir ácido láctico pode ser lactato desidrogenase.

Em uma modalidade, um método para produzir etanol inclui transformar um organismo nativo para produzir uma bactéria Gram-positiva que tenha sido transformada para eliminar a expressão de todos os genes que conferem à bactéria Gram-positiva a capacidade de produzir ácidos orgânicos como produtos de fermentação, para produzir um hospedeiro bacteriano transformado, e cultivar o hospedeiro bacteriano transformado em meio que contém um substrato incluindo um material selecionado entre o grupo consistindo em glicose, xilose, celobiose, sacarose, xilano, amido, e combinações dos mesmos sob condições adequadas por um período de tempo suficiente para possibilitar a sacarificação e fermentação do substrato.

Em uma modalidade, é descrita uma cultura biologicamente pura

de um microorganismo designado ALK1 e depositado junto à ATCC sob a Designação de Depósito de Patente Nº PTA-7206.

Em uma modalidade um polinucleotídeo isolado compreende (a) uma seqüência de SEQ ID NO: 10, ou (b) uma seqüência de SEQ ID NO: 9 e SEQ ID NO: 10, ou (c) uma seqüência tendo no mínimo cerca de 90% de identidade de seqüência com a seqüência de (a) ou (b). É descrito um vetor compreendendo o polinucleotídeo isolado de (a), (b), ou (c), bem como uma célula hospedeira produzida por engenharia genética para expressar um complemento do polinucleotídeo de (a), (b), ou (c). Em outra modalidade, um polinucleotídeo isolado compreende uma seqüência tendo no mínimo cerca de 95% de identidade de seqüência com a seqüência de (a) ou (b).

Em uma modalidade, um método para produzir etanol inclui cultivar uma bactéria mutante expressando um complemento do polinucleotídeo isolado de (a), (b), ou (c) em meio contendo um substrato selecionado entre o grupo consistindo em glicose, xilose, celobiose, sacarose, xilano, amido, e combinações dos mesmos sob condições adequadas por um período de tempo suficiente para possibilitar fermentação do substrato para etanol.

Breve Descrição dos Desenhos

A figura 1 mostra reações do caminho glicolítico.

A figura 2 mostra produção de hidrogênio em *T. saccharolyticum* selvagem comparada com várias cepas de nocaute de *T. saccharolyticum*.

A figura 3 mostra uma comparação de seqüências de polinucleotídeos experimentais e esperadas para a região *ldh* do vetor suicida pSGD9 (SEQ ID NO: 9) integrado no genoma de *T. saccharolyticum*.

A figura 4 mostra uma comparação de seqüências de polinucleotídeos experimentais e esperadas para a região *pta/ack* do vetor suicida pSGD8-Erm (SEQ ID NO: 10) integrado no genoma de *T. saccharolyticum*.

As figuras 5-7 mostram traços de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) de um caldo de fermentação em vários intervalos de tempo durante crescimento de ALK1.

A figura 8 mostra as concentrações de xilose, ácido orgânico e etanol durante fermentação por cepa ALK1.

A figura 9 mostra as concentrações de xilose, ácido orgânico e etanol durante fermentação por *T. saccharolyticum* selvagem.

A figura 10 mostra as concentrações de xilose, ácido orgânico e etanol durante um estímulo de cultura contínua de ALK1.

A figura 11 mostra as concentrações de xilose, ácido orgânico e etanol durante fermentação para cepa ALK2.

Descrição Detalhada

Agora serão mostrados e descritos métodos para produzir e utilizar bactérias Gram-positivas termofílicas, anaeróbicas, na conversão de biomassa em etanol.

Conforme usado aqui, um organismo está em "um estado nativo" se não tiver sido produzido por engenharia genética ou manipulado de modo diverso pela mão do homem em uma maneira que altera intencionalmente a constituição genética e/ou fenotípica dos organismo. Por exemplo, organismos selvagens podem ser considerados como estando em um estado nativo.

A completa eliminação da produção de ácido orgânico de uma *T. saccharolyticum* em um estado nativo foi obtida usando dois eventos de recombinação homóloga de DNA sítio-dirigida. A cepa mutante, *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* JW/SL-YS485 ALK1 ("ALK1") produz quantidades quase teóricas de etanol em baixas alimentações de substrato em cultura em lotes com uma temperatura em uma faixa de cerca de 30 a 66°C e um pH em uma faixa de cerca de 3,85 a 6,5. Em uma modalidade, a produção de etanol é de no mínimo cerca de 90% do máximo teórico. ALK1, e seus descendentes, têm o potencial de contribuir com significativas economias na biomassa lignocelulósica para conversão de etanol devido a suas condições de crescimento, as quais são substancialmente otimizadas para a atividade da celulase em um processo simultâneo de sacarificação e co-fermentação (SSCF) . Por exemplo, parâmetros de ótima atividade da celulase incluem um pH entre 4 e 5 e temperatura entre 40 e 50°C. Adicionalmente, não é necessário ajustar o pH do caldo de fermentação quando são usados organismos de nocaute, os quais carecem da habilidade de produzir ácidos or-

gânicos. ALK1, e organismos similares, também podem ser adequados para uma fermentação de co-cultura de bioprocessamento consolidado onde o organismo de nocaute converteria pentoses em etanol, e a celulose seria degradada por um organismo celulolítico tal como *C. thermocellum*.

Operando ou um processo SSCF ou CBP em temperaturas termofílicas oferece vários benefícios importantes em relação às temperaturas de fermentação mesofílicas convencionais de 30 a 37°C. Em particular, os custos para uma etapa de processo dedicada para produção de celulase são substancialmente reduzidos (por exemplo, 2 vezes ou mais) para SSCF termofílicas e são eliminados para CBP. Também se espera que os custos associados com resfriamento do fermentador e também com permuta térmica antes e depois da fermentação sejam reduzidos tanto para SSCF quanto para CBP termofílicas. Finalmente, processos caracterizando biocatalisadores termofílicos podem ser menos suscetíveis a contaminação microbiana comparados com processos caracterizando biocatalisadores mesofílicos convencionais.

Em contraste com microorganismos "de fermentação de homoe-tanol" conhecidos, tais como *Saccharomyces cerevisiae* e *Zymomonas mobilis* naturais, e cepas recombinantes de *Escherchia coli* e *Klebsiella oxytoca*, os organismos presentemente descritos não dependem da conversão de piruvato em acetaldeído através da ação da piruvato decarboxilase (figura 1, 9). De fato, bactérias pertencentes ao gênero *Thermoanaerobacter* não expressam piruvato decarboxilase no estado nativo. A partida das reações do caminho glicolítico mostrado na figura 1, pode ser observado que o piruvato pode ser metabolizado para acetil-CoA, dióxido de carbono, e ferredoxina reduzida pela enzima piruvato-ferredoxina oxidorreductase, 2. No entanto, de modo a produzir etanol como o único produto de fermentação, os elétrons carregados pela ferredoxina reduzida devem ser todos transferidos para NAD através da NAD:ferredoxina oxidorreductase, 3, para formar NADH. NADH é subsequente oxidado de volta para NAD no curso da redução em duas etapas da acetil-CoA em etanol por acetaldeído deidrogenase, 7, e álcool deidrogenase, 8. Evidência da eficiente utilização de NADH pode ser

observada na figura 2 como uma redução na produção de H₂ tanto pelo organismo de nocaute de acetato, o qual é útil para expressar *ack* e *pta*, quanto pelo organismo de duplo nocaute (ALK1), o qual é útil para expressar *ack*, *pta* e *ldh*. Estes organismos proporcionam a primeira demonstração de transferência de elétrons estequiométrica de ferredoxina reduzida para NAD, e subsequentemente para etanol.

O caminho descrito acima, o qual produz produções de etanol estequiométricas em organismos que não possuem a capacidade de expressar PDC, está em contraste com o caminho empregado em todas as cepas de fermentação de homoetanol previamente descritas. As cepas previamente descritas utilizam piruvato decarboxilase (PDC) endógena, ou são produzidas para expressar PDC endógena. Como a expressão da PDC é rara no mundo microbiano, a capacidade para redirecionar o fluxo de elétrons em virtude de modificações para fluxo de carbono tem amplas implicações. Por exemplo, esta abordagem pode ser usada para produzir altas produções de etanol em cepas diferentes de *T. saccharolyticum* e/ou para produzir solventes diferentes de etanol. Em particular, bactérias Gram-positivas, tais como membros do gênero *Thermoanaerobacter*; *Clostridium thermocellum* e outros Clostrídios termofílicos e mesofílicos; espécies de *Bacillus* termofílicos e mesofílicos; bactérias Gram-negativas, tais como *Escherichia coli* e *Klebsiella oxytoca*; *Fibrobacter succinogenes* e outras espécies *Fibrobacter*; *Thermoga neopolitana* e outras espécies *Thermotoga*; e fungos anaeróbicos incluindo as espécies *Neocallimatis* e *Piromyces* carecem da capacidade para expressar PDC, e podem se beneficiar dos meios descritos.

Será reconhecido que o material lignocelulósico pode ser qualquer matéria-prima que contém um ou mais entre glicose, xilose, manose, arabinose, galactose, frutose, celbiose, sacarose, maltose, xilano, manano e amido. Em várias modalidades, a biomassa lignocelulósica compreende madeira, palha de milho, serragem, casca de árvore, folhas, resíduos agrícolas e de regiões florestais, gramíneas tais como "switchgrass" produtos da digestão de ruminantes, rejeitos municipais, efluentes de fábricas de papel, jornal, papelão, ou combinações dos mesmos.

Exemplo 1

Produção da cepa ALK1

Materiais e Métodos

Thermoanaerobacterium saccharolyticum cepa JW/SL-YS485 (DSM 8691) é uma bactéria termofílica, anaeróbica isolada do West Thumb Basin in Yellowstone National Park, Wyoming (Lui, S.Y; Gherardini, F.C.; Matuschek, M.; Bahl, H.; Wiegel, J. "Cloning, sequencing, and expression of the gene encoding a large S-layer-associated endoxylanase from *Thermoanaerobacterium* sp strain JW/SL-YS485 in *Escherichia coli*" J. Bacteriol. **178**: 1539-1547, 1996; Mai, V.; Wiegel, J. "Advances in development of a genetic system for *Thermoanaerobacterium* spp: Expression of genes encoding hydrolytic enzymes, development of a second shuttle vector, and integration of genes into the chromosome" Appl. Environ. Microbiol. **66**: 4817-4821, 2000). Cresce em uma faixa de temperatura de 30 a 66°C e em uma faixa de pH de 3,85 a 6,5. Consome uma variedade de substratos derivados da biomassa incluindo os monossacarídeos glicose e xilose, os dissacarídeos celobiose e sacarose, e os polissacarídeos xilano e amido, mas não celulose. O organismo produz etanol bem como os ácidos orgânicos, ácido láctico e ácido acético como produtos de fermentação primária.

Clonagem e Seqüenciamento

Os genes de lactato desidrogenase (*L-ldh*), fosfotransacetilase (*pta*), e acetato quinase (*ack*) foram identificados e seqüenciados usando técnicas padronizadas, conforme reportado previamente para *L-ldh* (Desai, 2004). Iniciadores degenerados foram preparados usando o algoritmo CODE-HOP (Rose, T.; Schultz, E.; Henikoff, J.; Pietrokovski, S.; McCallum, C.; Henikoff, S. "Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly-related sequences" Nucleic Acids Research, **26**(7):1628-1635, 1 Apr 1998) e reações de PCR foram realizadas para obter a seqüência de DNA entre regiões conservadas. Os fragmentos genéticos fora das regiões conservadas foram seqüenciados diretamente a partir do DNA genômico usando enzima ThermoFidelase (Fidelity Systems, Gaithersburg, MD) com kit v3.1 de BigDye Terminator (ABI, Foster City CA).

Construção de Vetores Suicidas

Vetor de nocaute de acetato quinase e fosfotransacetilase, pSGD9

Foram seguidas técnicas de clonagem de rotina (Sambrook). O vetor suicida de 6,2 kb pSGD9 foi à base de pBLUESCRIPT II SK (+) (Stratagene) usando uma abordagem de design similar à reportada anteriormente (Desai, 2004; Mai, 2000). Fragmentos genéticos da seqüência *pta/ack*, *pta-up* (~1,2 kb) e *ack-down* (~0,6 kb), foram amplificados a partir de DNA genômico usando os pares de iniciadores SEQ ID NOS: 1-2, e SEQ ID NOS: 3-4. Foi feita amplificação por PCR com pfu DNA polimerase e os fragmentos foram extraídos de um gel de eletroforese a 1%. Os fragmentos *pta-up* e *ack-down* foram em seguida A-tailed com Taq polimerase e clonados em TOPO pCR2.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Um fragmento de 1,5 kb contendo o marcador de canamicina foi obtido de uma digestão por *Pst*I/*Xba*I de pKM1 e subclonado em pBLUESCRIPT II SK (+). TOPO contendo *pta-up* foi digerido com *Xho*I/*Bsi*HKAI e subclonado em pBLUESCRIPT II SK (+) digerido com *Xho*I/*Pst*I, a montante do marcador de canamicina previamente subclonado. TOPO contendo *ack-down* foi digerido com *Xba*I/*Sph*I e subclonado em pUC19 (Invitrogen). O fragmento *Xba*I/*Afl*III contendo *ack-down* foi digerido e subclonado a jusante do marcador de canamicina para obter o constructo final pSGD9.

Vetor de nocaute de lactato deidrogenase com resistência a eritromicina, pSGD8-Erm

O vetor suicida de 5,5 kb pSGD8-Erm foi à base do plasmídeo pSGD8 conforme produzido por Desai et al. 2004. Ao invés do marcador de antibiótico de canamicina *aph*, foram usados um gene de fusão à base do promotor *aph* do plasmídeo pKM1 e o gene de adenina metilase conferindo resistência a eritromicina do plasmídeo pCTC1 (Klapatch, T.R.; Guerinot, M.L.; Lynd, L.R. "Electrotransformation of *Clostridium thermosaccharolyticum*" J. Ind. Microbiol. **16**(6): 342-7, June 1996) foram usadas para seleção. Fragmentos genéticos de PCR foram criados usando pfu polimerase (Stratagene) e os iniciadores SEQ ID NOS: 5-6 para o promotor *aph* e SEQ ID NOS: 7-8 para a fase de leitura aberta de adenina metilase. Os fragmentos

foram digeridos com *XbaI/BamHI* (fragmento *aph*) e *BamHI/EcoRI* (adenina metilase) e ligados no sítio de clonagem múltipla de pIKM1. Este gene de fusão foi em seguida excisado com *BseRI/EcoRI* e ligado em pSGD8 digerido de modo similar.

Transformação de *T. saccharolyticum*

A transformação de *T. saccharolyticum* foi realizada de modo intercambiável com dois métodos, o primeiro conforme previamente descrito (Mai, V.; Lorenz, W.; Weigel, J. "Transformation of *Thermoanaerobacterium* sp. strain JW/SL-YS485 with plasmid PIKM1 conferring kanamycin resistance" FEMS Microbiol. Lett. **148**: 163-167, 1997) e o segundo com várias modificações depois da coleta celular e baseado no método desenvolvido para *Clostridium thermocellum* (Tyurin, M. V.; Desai, S. G.; Lynd, L. R. "Electrotransformation of *Clostridium thermocellum*" Appl. Environ. Microbiol. **70**(2): 883-890, 2004). As células foram cultivadas de um dia para o outro usando meio pré-reduzido DSMZ 122 em tubos de cultura descartáveis estéreis dentro de uma câmara anaeróbica em uma incubadora mantida a 55°C. Depois disso, as células foram subcultivadas com 4 µg/ml de hidrazida de ácido isonicotônico (isoniacina), um agente de enfraquecimento da parede celular (Hermans, J.; Boschloo, J.G.; de Bont, J.A.M. "Transformation of *M. aurum* by electroporation: the use of glycine, lysozyme and isonicotinic acid hydrazide in enhancing transformation efficiency" FEMS Microbiol. Lett. **72**, 221-224, 1990), adicionado ao meio depois da fase *lag* inicial. Células da fase exponencial foram colhidas e lavadas com solução estéril fria pré-reduzida de celobiose a 200 mM, e ressuspensas na mesma solução e mantidas sobre gelo. Foi tomado cuidado extremo depois da coleta das células para mantê-las frias (aproximadamente 4°C) o tempo todo inclusive durante o tempo de centrifugação.

Amostras compostas de 90 µl da suspensão celular e 2 a 6 µl de pSGD9 ou pSGD8-Erm (1 a 3 µg) adicionados logo antes da aplicação de pulso, foram colocadas dentro de tubos descartáveis de microcentrifuga de polipropileno estéreis de 2 ml serviram como cuvetas de eletrotransformação. Foi aplicada uma onda quadrada com duração da pulsação ajustada em

10 ms usando um sistema gerador de pulso / de eletrodo de titânio personalizado. Um limiar de voltagem correspondente à formação de eletroporos em uma amostra celular foi avaliado como uma alteração de corrente não linear quando a voltagem do pulso foi aumentada linearmente em incrementos de 200 V. Foi usada uma voltagem particular que proporcionou a melhor proporção de produção de transformação versus índice de viabilidade celular em uma dada concentração de DNA, a qual neste caso em particular foi de 25 kV/cm. Células pulsadas foram inicialmente diluídas com 500 µl de meio DSM 122, mantidas sobre gelo por 10 minutos e em seguida recuperadas em 55°C por 4 a 6 horas. Depois da recuperação, células transformadas com pSGD9 foram misturadas com 2% de meio agar contendo canamicina em 75 µg/ml e vertidas sobre placas de petri e incubadas em jarras anaeróbicas por 4 dias. Células transformadas com pSGD8-Erm foram deixadas para recuperar em 48°C por 4 a 6 horas e foram ou laminadas em 2% de meio agar em pH 6,0 contendo eritromicina em 5 µg/ml ou meio líquido similar e incubadas em jarras anaeróbicas em 48°C por 6 dias. Quaisquer das linhagens celulares transformadas podem ser usadas sem manipulação adicional. No entanto, um organismo onde a eliminação da expressão de todos os genes que conferem a capacidade de produzir ácidos orgânicos foi obtida realizando uma segunda transformação (seqüencial). A segunda transformação foi realizada conforme descrito acima com o mutante primário substituído pela suspensão celular não-transformada. O mutante secundário, ALK1, foi cultivado sobre meio contendo tanto canamicina quanto eritromicina.

Seqüenciamento de Regiões de Nocaute

O seqüenciamento das regiões de nocaute sítio dirigido foi feito por PCR a partir de DNA genômico usando Taq polymerase (New England Biolabs) e iniciadores fora das regiões de sobreposição homóloga entre o genoma e os vetores suicidas. Iniciadores dentro dos produtos de PCR foram usados para seqüenciamento com o kit BigDye Terminator v3.1 (ABI, Foster City, CA). As regiões foram dispostas usando o programa de software CAP3 (Huang, X. "An improved sequence assembly program" *Genomics* **33**: 21-31, 1996) e comparadas com a seqüência de DNA esperada usando o

algoritmo CLUSTALW (Higgins, D. G.; Bleasby, A. J.; Fuchs, R. "CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment" *Computer Applications in the Biosciences (CABIOS)*, 8(2): 189-191, 1992). Existiu um alto grau de homologia (percentagem de identidade) entre a seqüência compilada experimentalmente e a seqüência esperada com base nas seqüências conhecidas selvagens e de vetores suicidas (figuras 3 e 4).

"Identidade" refere-se a uma comparação entre pares de moléculas de aminoácido ou ácido nucléico. São conhecidos métodos para determinar identidade de seqüência. Vide, por exemplo, programas de computador comumente empregados para este fim, tais como o programa Gap (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison Wisconsin), que usa o algoritmo de Smith e Waterman, 1981, *Adv. Appl. Math.* 2: 482-489.

Verificação de Cepa Mutante

DNA genômico da cepa mutante *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* JW/SL-YS485 ALK1 ("ALK1") apresentou a recombinação homóloga sítio-dirigida esperada nos loci *L-ldh* e *pta/ack* através de seqüenciamento de DNA. Ambos os eventos de integração foram integrações duplas, a qual é um genótipo mais geneticamente estável.

Exemplo 2

Dados Comparativos Mostrando a Produção de Etanol por ALK1 E *T. Saccharolyticum* Selvagem

T. saccharolyticum foi cultivado em meio parcialmente definido MTC contendo 2,5 g/L de extrato de levedura (Zhang, Y.; Lynd, L. R. "Quantification of cell and cellulase mass concentrations during anaerobic cellulose fermentation: development of an enzyme-linked immunosorbent assay-based method with application to *Clostridium thermocellum* batch cultures" *Anal. Chem.* 75: 219-222, 2003). Glicose, xilose, acetato, lactato e etanol foram analisados por HPLC sobre uma coluna Aminex 87H (BioRad Laboratories, Hercules, CA) a 55°C. A fase móvel consistiu em 5 mM de ácido sulfúrico em um índice de fluxo de 0,7 ml/min. A detecção foi através de índice refrativo usando um refractômetro Waters 410 (Milford, MA). O nível de detecção mí-

nimo para acetato foi de 1,0 mM. Um traço padrão contendo 5 g/L de xilose, 5 g/L de ácido láctico, 5 g/L de ácido acético e 5 g/L de etanol é mostrado na figura 5.

A cepa ALK1 produziu somente etanol com até 17 g/L de xilose, ou com 5 g/L de xilose e 5 g/L de glicose, sem ácidos orgânicos ou outros produtos detectados por HPLC. A figura 6 mostra a fermentação da cepa ALK1 no momento 0 horas e a figura 7 mostra a mesma fermentação em 72 horas. Gráficos de curso de tempo-fermentação da cepa ALK1 e selvagem sobre meio de xilose tamponado com 8 g/L de MES em um pH inicial de 6,0, 55°C e 100 rpm mostram que a cepa ALK1 é capaz de converter mais de 99% de xilose em etanol (figura 8), enquanto a selvagem sob condições similares se torna limitada pelo pH devido à produção de ácido orgânico e é incapaz de consumir toda a xilose presente (figura 9). O organismo selvagem produziu 0,15 mM de etanol, ao passo que ALK1 produziu 0,46 mM de etanol.

Exemplo 3

Evolução de ALK1

Conforme mostrado na figura 10, uma cultura contínua na qual a concentração da alimentação do substrato foi aumentada com o tempo foi utilizada para testar ALK1. A figura 10 mostra as concentrações de xilose, xilulose e etanol durante a cultura contínua. Depois de mais de 1000 horas de exposição a este ciclo de stress-evolução, uma cepa aprimorada, ALK2, foi isolada do caldo de fermentação. ALK2 foi capaz de iniciar o crescimento em 50 g/L de xilose em cultura por lotes. A figura 11 mostra as concentrações de etanol e densidade óptica (DO) de xilose, ácido orgânico, e durante fermentação pela cepa ALK2.

Depósito de ALK1

ALK1 foi depositado junto à American Type Culture Collection, Manassas, VA 20110-2209. O depósito foi feito em 1º de novembro de 2005 e recebeu o Número de Designação do Depósito de Patente PTA-7206. Este depósito foi feito de acordo com os requisitos do Tratado de Budapeste de que a duração do depósito deve ser por trinta (30) anos a partir da data de

depósito ou por cinco (5) anos depois da última solicitação para o depósito no depositário ou pelo tempo vigente de uma Patente U.S. que vence a partir deste requerimento de patente, o que for mais longo. ALK1 será repostado caso se torne não viável no depositário.

A descrição das modalidades específicas revela conceitos gerais que outros podem modificar e/ou adaptar para várias aplicações ou usos que não se afastam dos conceitos gerais. Portanto, as adaptações e modificações referidas devem ser e pretende-se que sejam incluídas dentro do significado e da faixa de equivalentes das modalidades descritas. Deve ser entendido que a fraseologia ou terminologia empregada aqui, neste requerimento de patente, é para os fins de descrição e não limitação.

Os exemplos precedentes podem ser modificados convenientemente para uso em qualquer bactéria Gram-positiva, e especialmente membros do gênero *Thermoanaerobacter* incluindo *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes*, *Thermoanaerobacterium aotearoense*, *Thermoanaerobacterium polysaccharolyticum*, *Thermoanaerobacterium zeae*, *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, e *Thermoanaerobacterium xylanolyticum*.

Todas as referências mencionadas neste requerimento são incorporadas por meio de referência na mesma extensão como se plenamente reproduzidas aqui, neste requerimento de patente.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

- <110> The Trustees of Dartmouth College
 Lynd, Lee R.,
 Shaw, Arthur Josephus
 Desai, Sunil G.
 Tyurin, Mikhail V.
- <120> **ORGANISMOS TERMOFÍLICOS PARA CONVERSÃO DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA EM ETANOL**
- <130> 454555
- <140> Ainda não determinado
 <141> 2006-10-31
- <150> US 60/731,674
 <151> 2005-10-31
- <150> US 60/796,380
 <151> 2006-05-01
- <160> 10
- <170> Versão de patente 3.2
- <210> 1
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
- <220>
 <223> Iniciador pta
- <400> 1
 acatgcatgc ccatttgtct ataatagaag gaag 34
- <210> 2
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
- <220>
 <223> Iniciador pta
- <400> 2
 cgtcaacaat atctctatag ctgc 24
- <210> 3
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
- <220>
 <223> iniciador ack
- <400> 3
 gctctagagc atagaattag ctccactgc 29
- <210> 4
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> iniciador ack

 <400> 4
 acatgcatgc cgacgcctcc catagctgct gcat 34

 <210> 5
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

 <220>
 <223> Iniciador aph

 <400> 5
 tggatccgcc atttattatt tcttctctet ttcc 34

 <210> 6
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

 <220>
 <223> Iniciador aph

 <400> 6
 ttctagatgg ctgcaggtcg ataaacc 27

 <210> 7
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

 <220>
 <223> Iniciador adenina metilase

 <400> 7
 gcggatccca tgaacaaaa tataaaatat tctc 34

 <210> 8
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

 <220>
 <223> Iniciador adenina metilase

 <400> 8
 gcgaattccc tttagtaacg tgtaactttc c 31

 <210> 9
 <211> 2778
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

 <220>
 <223> Locus L-ldh de termoanaerobacterium Saccharolyticum nocaute

 <400> 9
 ggaaacgaat agtaaaggaa tggaggcgaa ttaatgagta atgtcgcaat gcaattaata 60

gaaatttgtc	ggaaatatgt	aaataataat	ttaaacataa	atgaatttat	cgaagacttt	120
caagtgcttt	atgaacaaaa	gcaagattta	ttgacagatg	aagaaatgag	cttgtttgat	180
gatatttata	tggcttgtga	atactatgaa	caggatgaaa	atataagaaa	tgaatatcac	240
ttgtatattg	gagaaaatga	attaagacaa	aaagtgcaaa	aacttgtaaa	aaagttagca	300
gcataataaa	ccgctaaggc	atgatagcta	aagcggattt	tttatgcaat	taaagggatg	360
aatgatatc	tgataaactg	cgaaaaagta	ttttagaaaa	taactataaa	gataatattt	420
caaatcaata	aggacaaaa	aagattaaaa	tttagacaat	ttcatcaaaa	ctatgttata	480
atattattaa	aggaaaatac	atattattta	ggaggcgatg	taatgagcaa	ggtagcaata	540
ataggatctg	gttttgtagg	tgcaacatcg	gcatttacgc	tggcattaag	tgggactgtg	600
acagatatcg	tgctggtgga	tttaaacaag	gacaaggcta	taggcgatgc	actggacata	660
agccatggca	taccgcta	acagcctgta	aatgtgtatg	caggtgacta	caaagatgtg	720
aaagggcgag	atgtaatagt	tgtgacagca	ggtgctgctc	aaaagccggg	agagacacgg	780
cttgacctg	taaagaaaa	tacagccata	tttaagtcca	tgatacctga	gcttttaaag	840
tacaatgaca	aggccatata	tttgattgtg	acaaatcccg	tagatatact	gacgtacggt	900
acatacaaga	tttctggact	tccatggggc	agagtttttg	gttctggcac	cgttcttgac	960
agctcaaggt	ttagatacct	tttaagcaag	gactgctgca	ggtcgataaa	cccagcgaac	1020
catttgaggt	gataggtaag	attataccga	ggtatgaaaa	cgagaattgg	acctttacag	1080
aattactcta	tgaagcgcca	tatttaaaaa	gctaccaaga	cgaagaggat	gaagagggatg	1140
aggaggcaga	ttgccttgaa	tattattgaca	atactgataa	gataatatat	cttttatata	1200
gaagatatcg	ccgtatgtaa	ggatttcagg	gggcaaggca	taggcagcgc	gcttatcaat	1260
atatctatag	aatgggcaaa	gcataaaaac	ttgcatggac	taatgcttga	aaccagggac	1320
aataacctta	tagcttgtaa	attctatcat	aattgtggtt	tcaaaatcgg	ctccgtcgat	1380
actatgttat	acgccaactt	tgaaaacaac	tttgaaaaag	ctgttttctg	gtatttaagg	1440
ttttagaatg	caaggaacag	tgaattggag	ttcgtcttgt	tataattagc	ttcttggggt	1500
atcttttaat	actgtagaaa	agaggaagga	aataataaat	ggcggatccc	atgaacaaaa	1560
atataaaata	ttctcaaac	tttttaacga	gtgaaaaagt	actcaaccaa	ataataaac	1620
aattgaattt	aaaagaaacc	gataccgttt	acgaaattgg	aacaggtaaa	gggcatttaa	1680
cgacgaaact	ggctaaaata	agtaaacagg	taacgtctat	tgaattagac	agtcacttat	1740
tcaacttatc	gtcagaaaa	ttaaaactga	atactcgtgt	cactttaatt	caccaagata	1800
ttctacagtt	tcaattccct	aacaaacaga	ggtataaaat	tgttgggagt	attccttacc	1860
atttaagcac	acaattatt	aaaaaagtgg	ttttgaaag	ccatgcgtct	gacatctatc	1920
tgattgttga	agaaggattc	tacaagcgta	ccttggatat	tcaccgaaca	ctagggttgc	1980
tcttgcacac	tcaagtctcg	attcagcaat	tgcttaagct	gccagcgaa	tgctttcatc	2040
ctaaaccaa	agtaaacagt	gtcttaataa	aacttaccg	ccataccaca	gatgttccag	2100

ataaatattg gaagctatat acgtactttg tttcaaaatg ggtcaatcga gaatatcgtc 2160
 aactgtttac taaaaatcag tttcatcaag caatgaaaca cgccaaagta aacaatttaa 2220
 gtaccgttac ttatgagcaa gtattgtcta tttttaatag ttatctatta ttaacggga 2280
 ggaaataatt ctatgagtcg cttttgtaaa tttggaaagt tacacgttac taaagggat 2340
 tctctagaca gagtttgag catggagcat acaaacata tcgggtatat catttaatga 2400
 gtactgcagc atatgcgagc gcgtctgcaa cacaaatttc agaaaggaag tagaagaaga 2460
 agtcgtaaat gctgcttaca agataataga caaaaaaggt gctacatact atgctgtggc 2520
 agttgcagta agaaggattg tggagtgcac cttaagagat gaaaattcca tcctcacagt 2580
 atcatctcca ttaaattggac agtacggcgt gaaagatggt tcattaagct tgccatctat 2640
 cgtaggcagg aatggcggtg ccaggatfff ggacttgctt ttatctgacg aagaagtgga 2700
 gaagtttagg cattcagcaa gtgtcatggc agatgtcata aaacaattag atatataatc 2760
 aaattatggt gggaggct 2778

<210> 10
 <211> 3355
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Locus pta/ack de termoanaerobacterium Saccharolyticum nocaute

<220>
 <221> propriedades mistas
 <222> (2632)..(2634)
 <223> n is a, c, g ou t

<220>
 <221> propriedades mistas
 <222> (3262)..(3265)
 <223> n is a, c, g, ou t

<400> 10
 agcgctgtac gaaattgcc a ctattacag ctacgacaaa gtctgctttt gtcatttcca 60
 tagacttttt tatgtgatat acgtgcccac tgtgaagtgg attgtattct acaattaaac 120
 ctaatagcgt cataatatgc gcctttctaa aaaattatta attgtactta ttattttata 180
 aaaaatatgt taaaatgtaa aatgtgtata caatatattt cttcttagta agaggaatgt 240
 ataaaaataa atattttaaa ggaagggacg atcttatgag cattattcaa aacatcattg 300
 aaaaagctaa aagcgataaa aagaaaattg ttctgccaga aggtgcagaa cccaggacat 360
 taaaagctgc tgaaatagtt taaaagaag ggattgcaga tttagtgcct cttggaaatg 420
 aagatgagat aagaaatgct gcaaaagact tggacatata caaagctgaa atcattgacc 480
 ctgtaaagtc tgaaatgttt gataggtatg ctaatgattt ctatgagtta aggaagaaca 540
 aaggaatcac gttggaaaaa gccagagaaa caatcaagga taatatctat tttggatgta 600
 tgatgggttaa agaaggttat gctgatggat tggtatctgg cgctattcat gctactgcag 660

atattattaag	acctgcattt	cagataatta	aaacggctcc	aggagcaaag	atagtatcaa	720
gcttttttat	aatggaagtg	cctaattgtg	aatatgggta	aatgggtgta	ttcttgtttg	780
ctgattgtgc	ggtcaacca	tcgcctaata	cagaagaact	tgcttctatt	gccgtacaat	840
ctgctaatac	tgcaaagaat	ttgttgggct	ttgaacaaa	agttgccatg	ctatcatttt	900
ctacaaaagg	tagtgcata	catgaattag	tagataaagt	aagaaaagcg	acagagatag	960
caaaagaatt	gatgccagat	gttgctatcg	acgggtgaatt	gcaattggat	gctgctcttg	1020
ttaaagaagt	tgcaagagct	aaagcgccgg	gaagcaaagt	tgccggatgt	gcaaatgtgc	1080
ttatattccc	tgatttaca	gctggtaata	taggatataa	gcttgtagag	aggtaggta	1140
aggcaaatgc	aattggacct	ataacacaag	gaatgggtgc	aggtagataa	accagcgaa	1200
ccatttgagg	tgataggtaa	gattataacc	aggtatgaaa	acgagaattg	gacctttaca	1260
gaattactct	atgaagcgcc	atatttaaaa	agctaccaag	acgaagagga	tgaagaggat	1320
gaggaggcag	attgccttga	atatattgac	aatactgata	agataatata	tcttttatat	1380
agaagatac	gccgtatgta	aggatttcag	ggggcaaggc	ataggcagcg	cgcttatcaa	1440
tatatctata	gaatgggcaa	agcataaaaa	cttgcattga	ctaattgctt	aaaccagga	1500
caataacctt	atagcttgta	aattctatca	taattgtggt	ttcaaatcgc	gctccgctga	1560
tactatgtta	tacgccaact	ttgaaaacaa	ctttgaaaaa	gctgttttct	ggtatttaag	1620
gttttagaat	gcaaggaaca	gtgaattgga	gttcgtcttg	ttataattag	cttcttgggg	1680
tatctttaa	tactgtagaa	aagaggaagg	aaataataaa	tggtctaaat	gagaatatca	1740
ccggaattga	aaaaactgat	cgaaaaatac	cgctgcgtaa	aagatacggg	aggaatgtct	1800
cctgctaagg	tatataagct	ggtgggagaa	aatgaaaacc	tatatttaa	aatgacggac	1860
agccgggata	aagggaccac	ctatgatgtg	gaacgggaaa	aggacatgat	gctatggctg	1920
gaaggaaagc	tgctgtttcc	aaaggtcctg	cactttgaac	ggcatgatgg	ctggagcaat	1980
ctgctcatga	gtgaggccga	tggcgtcctt	tgctcggag	agtatgaaga	tgaacaaagc	2040
cctgaaaaga	ttatcgagct	gtatgaggag	tgcatcaggc	tctttcactc	catcgacata	2100
tcggattgtc	cctatacgaa	tagcttagac	agccgcttag	ccgaattgga	ttacttactg	2160
aataacgatc	tggacgatgt	ggattgcaaa	aactgggaag	aagacactcc	atttaaagat	2220
ccgcgcgagc	tgtatgattt	tttaaagacg	gaaaagcccg	aagaggaact	tgtcttttcc	2280
cacggcgacc	tgggagacag	caacatcttt	gtgaaagatg	gcaaagtaag	tggctttatt	2340
gatcttggga	gaagcggcag	ggcggacaag	tggtatgaca	ttgccttctg	cgccgggtcg	2400
atcagggagg	atatcgggga	agaacagtat	gtcgagctat	tttttgactt	actggggatc	2460
aagcctgatt	gggagaaaat	aaaaaatat	atcttactgg	atgaattggt	ttagtaccta	2520
gatttagatg	tctaaaaagc	tttaactaca	agcttttttag	acatctaata	tttctgaag	2580
tacatccgca	actgtccata	ctctgatggt	ttatattctt	tctaaaagtt	cgcttagata	2640

ggggtcccga ggcctacga ggaatttgta tcgactctag agcatagaat atagctccac	2700
tgcacaatcc tgctaataata gaaggaatta aagcttgcca gcaaatcatg ccaaacgttc	2760
caatggtggc ggtatttgat acagcctttc atcagacaat gcctgattat gcatatcttt	2820
atccaatacc ttatgaatac tacacaaagt acaggattag aagatatgga tttcatggca	2880
catgcataa atatgtttca aatagggctg cagagatttt gaataaacct attgaagatt	2940
tgaaaatcat aacttgatcat cttggaaatg gctccagcat tgctgctgctc aaatatggta	3000
aatcaattga cacaagcatg ggatttacac cattagaagg tttggctatg ggtacacgat	3060
ctggaagcat agacccatcc atcatttcgt atcttatgga aaaagaaaat ataagcgctg	3120
aagaagtagt aaatatatta aataaaaaat ctgggtgttta cggatatttca ggaataagca	3180
gcgattttag agacttagaa gatgccgctt ttaaaaatgg agatgaaaga gctcagttgg	3240
ctttaaagt gtttgcatat cgangtaaag aagacgattg gcgcttatgc agcagactat	3300
gggaggcgtc gatgtcattg tatttacagc aggtgtgggt tggaaaatgg gtcca	3355

REIVINDICAÇÕES

1. Organismo isolado que fermenta um substrato celulolítico para produzir etanol em uma concentração que é no mínimo 90% de uma produção teórica, em que o organismo não expressa piruvato decarboxilase.

5 2. Método para produzir etanol, o referido método compreendendo:

transformar um organismo nativo para produzir o organismo isolado como definido na reivindicação 1 para proporcionar um hospedeiro transformado; e

10 cultivar o hospedeiro transformado em meio que contém um substrato incluindo um material selecionado entre o grupo consistindo em glicose, xilose, manose, arabinose, galactose, frutose, celobiose, sacarose, maltose, xilano, manano, amido, e combinações dos mesmos sob condições adequadas por um período de tempo suficiente para possibilitar a sacarificação e fermentação do substrato.

15 3. Organismo transformado compreendendo, uma bactéria Gram-positiva que em um estado nativo contém no mínimo um gene o qual confere à bactéria Gram-positiva a capacidade de produzir ácido acético como um produto de fermentação, a bactéria Gram-positiva sendo transformada para eliminar expressão do no mínimo um gene.

20 4. Bactéria Gram-positiva como definida na reivindicação 3, em que a bactéria Gram-positiva é um membro do gênero *Thermoanaerobacter*.

5. Bactéria Gram-positiva como definida na reivindicação 3, em que a bactéria Gram-positiva é um *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*.

25 6. Bactéria Gram-positiva como definida na reivindicação 3, em que o no mínimo um gene codifica para expressão de acetato quinase.

7. Bactéria Gram-positiva como definida na reivindicação 3, em que o no mínimo um gene codifica para a expressão de fosfotransacetilase.

30 8. Bactéria Gram-positiva como definida na reivindicação 3, em que o no mínimo um gene inclui uma pluralidade de genes.

9. Bactéria Gram-positiva de acordo com a reivindicação 8, em que a pluralidade de genes codifica para expressão de acetato quinase e

fosfotransacetilase.

5 10. Bactéria Gram-positiva de acordo com a reivindicação 9, adicionalmente transformada para eliminar expressão de um ou mais genes que conferem à bactéria Gram-positiva a capacidade de produzir ácido láctico como um produto de fermentação.

11. Bactéria Gram-positiva como definida na reivindicação 3, adicionalmente transformada para eliminar expressão de um ou mais genes que conferem à bactéria Gram-positiva a capacidade de produzir ácido láctico como um produto de fermentação.

10 12. Bactéria Gram-positiva de acordo com a reivindicação 11, em que o no mínimo um gene codifica para a expressão de lactato deidrogenase.

13. Método para produzir etanol, o referido método compreendendo:

15 transformar um organismo nativo para produzir a bactéria Gram-positiva de acordo com a reivindicação 11 para produzir um hospedeiro bacteriano transformado; e

20 cultivar o hospedeiro bacteriano transformado em meio que contém um substrato incluindo um material selecionado entre o grupo consistindo em glicose, xilose, manose, arabinose, galactose, frutose, celobiose, sacarose, maltose, xilano, manano, amido, e combinações dos mesmos sob condições adequadas por um período de tempo suficiente para possibilitar a sacarificação e fermentação do substrato.

25 14. Método de acordo com a reivindicação 13, em que o referido hospedeiro bacteriano é um *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*.

15. Método de acordo com a reivindicação 13, em que os genes codificam para a expressão de lactato deidrogenase, acetato quinase, e fosfotransacetilase.

30 16. Cultura biologicamente pura de um microorganismo designado ALK1 e depositado sob a Designação de Depósito de Patente Nº PTA-7206.

17. Polinucleotídeo isolado compreendendo:

(a) uma seqüência de SEQ ID NO: 10;
(b) uma seqüência de SEQ ID NO: 9 e SEQ ID NO: 10; ou
(c) uma seqüência tendo no mínimo cerca de 90% de identidade de seqüência com a seqüência de (a) ou (b).

5 18. Polinucleotídeo de acordo com a reivindicação 17, tendo cerca de 95% de identidade de seqüência com a seqüência de (a) ou (b).

19. Vetor compreendendo o polinucleotídeo isolado como definido na reivindicação 18.

10 20. Célula hospedeira produzida por engenharia genética para expressar um complemento do polinucleotídeo como definido na reivindicação 18.

21. Célula hospedeira de acordo com a reivindicação 20, em que a célula hospedeira é uma célula bacteriana.

15 22. Método para produzir etanol compreendendo a etapa de: cultivar uma bactéria mutante como definida na reivindicação 21 em meio contendo um substrato selecionado entre o grupo consistindo em glicose, xilose, manose, arabinose, galactose, frutose, celobiose, sacarose, maltose, xilano, manano, amido, e combinações dos mesmos sob condições adequadas por um período de tempo suficiente para possibilitar fermentação do substrato para etanol.

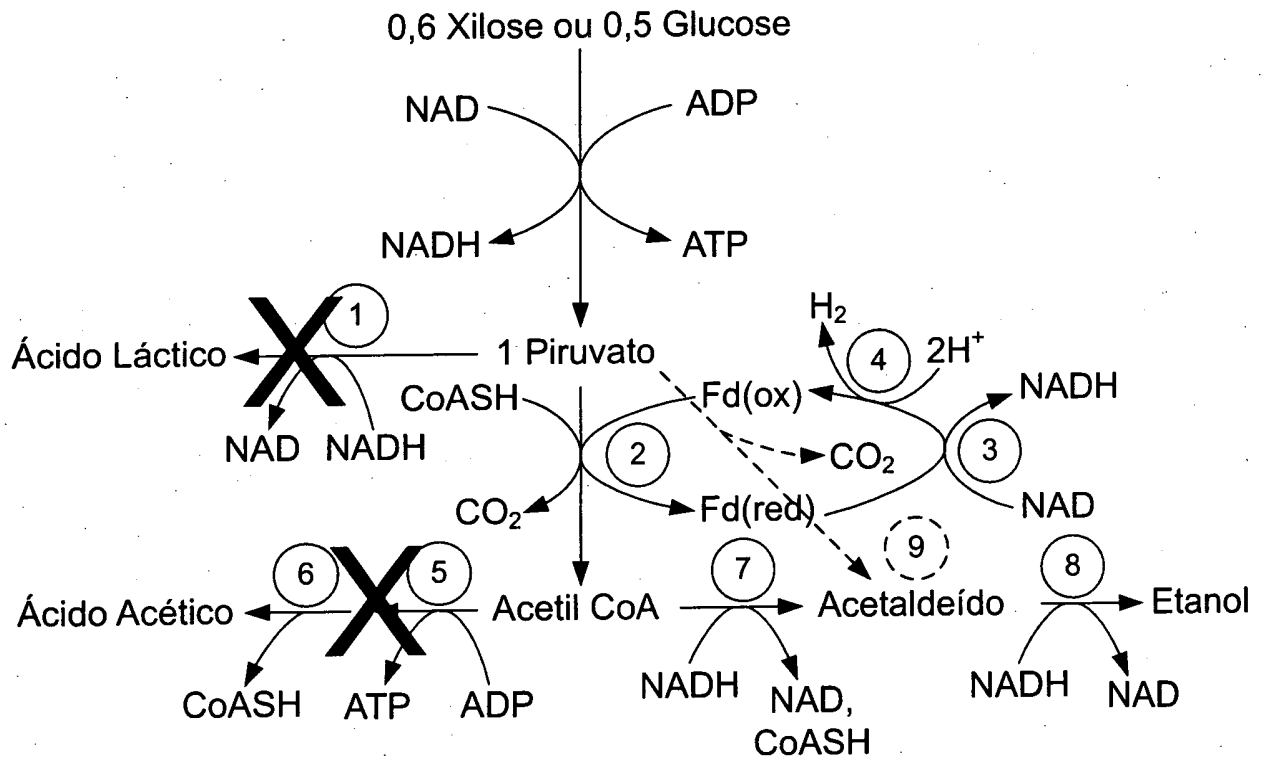
20 23. Método de acordo com a reivindicação 22, em que a bactéria mutante é *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*.

25 24. Método de acordo com a reivindicação 23, em que a bactéria mutante é *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* ALK1 (JW/SL-YS485 ALK1).

25. Constructo genético compreendendo SEQ ID NO: 10 conectado operavelmente a um promotor expressível em uma bactéria.

26. Bactéria recombinante compreendendo o constructo genético como definido na reivindicação 25.

30 27. Bactéria recombinante de acordo com a reivindicação 26, em que a referida bactéria é *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*.



1. Lactato deidrogenase
2. Piruvato-ferredoxina oxidorredutase
3. NADH-ferredoxina oxidorredutase
4. Hidrogenase
5. Fosfotransacetilase
6. Acetato quinase
7. Acetaldeído deidrogenase
8. Álcool deidrogenase
9. Piruvato decarboxilase (NÃO PRESENTE)

Fig. 1

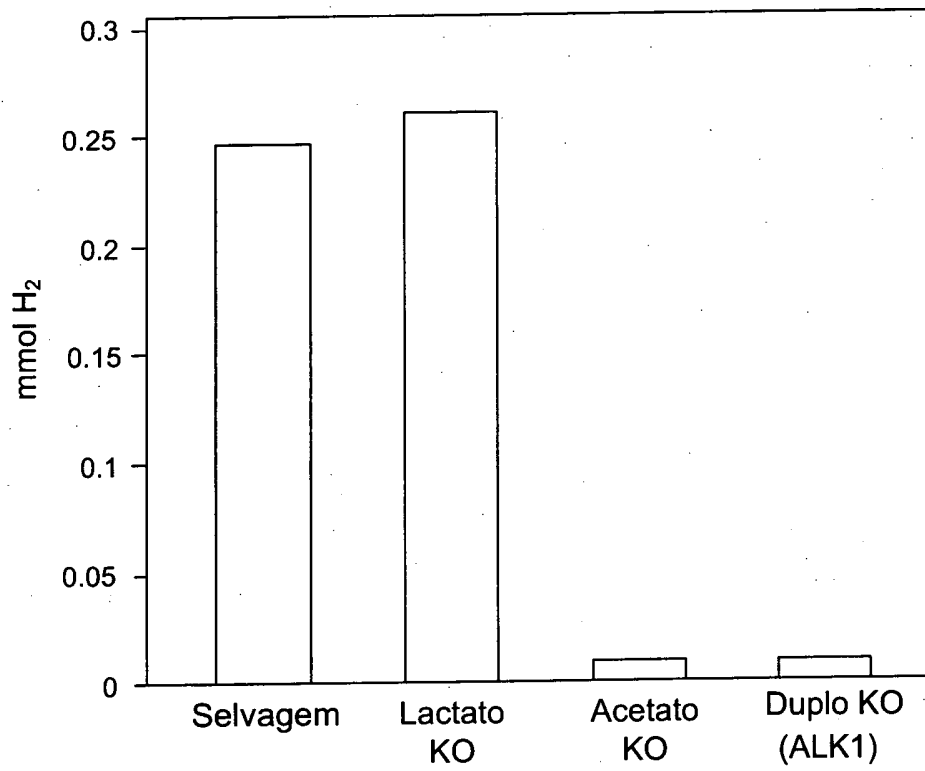
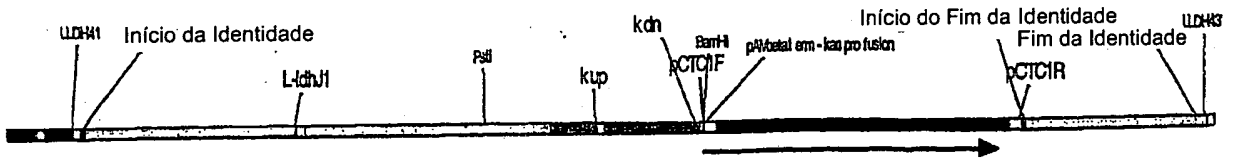


Fig. 2

Fig. 3



Alinhamento de seqüência – locus L-ldh

Linha 1: Seqüência compilada a partir da cepa ALK1

Linha 2: Seqüência esperada com base na seqüência L-ldh e vetor suicida pSGD8-erm

Consenso chave

- * - único, resíduo totalmente conservado
- nenhum consenso

CLUSTAL W (1.81) múltiplo alinhamento de seqüência

```

1ldh_erm_CAP3_seq_compiled -----GGAAACGAATAG
L-ldh_erm_region CGATAAAGAACATGGCTGGATAANTACTATAACTCCAAGGAAACGAATAG
*****

1ldh_erm_CAP3_seq_compiled TAAAGGAATGGAGGCGAATTAATGAGTAATGTCGCAATGCAATTAATAGA
L-ldh_erm_region TAAAGGAATGGAGGCGAATTAATGAGTAATGTCGCAATGCAATTAATAGA
*****

1ldh_erm_CAP3_seq_compiled AATTTGTCGGAATATGTAATAATAATTTAAACATAAATGAATTTATCG
L-ldh_erm_region AATTTGTCGGAATATGTAATAATAATTTAAACATAAATGAATTTATCG
*****

1ldh_erm_CAP3_seq_compiled AAGACTTTC AAGTGC TTTATGAACAAAAGCAAGATTTATGACAGATGAA
L-ldh_erm_region AAGACTTTC AAGTGC TTTATGAACAAAAGCAAGATTTATGACAGATGAA
*****

1ldh_erm_CAP3_seq_compiled GAAATGAGCTTGT TTTGATGATATTTATATGGCTTGTGAATACTATGAACA
L-ldh_erm_region GAAATGAGCTTGT TTTGATGATATTTATATGGCTTGTGAATACTATGAACA
*****

1ldh_erm_CAP3_seq_compiled GGATGAAAATATAAGAAATGAATATCACCTTGTATATTTGGAGAAAATGAAT
L-ldh_erm_region GGATGAAAATATAAGAAATGAATATCACCTTGTATATTTGGAGAAAATGAAT
*****

1ldh_erm_CAP3_seq_compiled TAAGACAAAAGTGCAAAAAC TTGTAAAAAGTTAGCAGCATAATAAACC
L-ldh_erm_region TAAGACAAAAGTGCAAAAAC TTGTAAAAAGTTAGCAGCATAATAAACC
*****
    
```

Fig. 3 (Continuação)

l1dh_erm_CAP3_seq_compiled L-l1dh_erm_region	GCTAAGGCATGATAGCTAAAGCGGTATTTTATGCAATTAAAAGGATGAA GCTAAGGCATGATAGCTAAAGCGGTATTTTATGCAATTAAAAGGATGAA *****
l1dh_erm_CAP3_seq_compiled L-l1dh_erm_region	ATGATATCTGATAAACTGCGAAAAAGTATTTAGAAAATAACTATAAAGA ATGATATCTGATAAACTGCGAAAAAGTATTTAGAAAATAACTATAAAGA *****
l1dh_erm_CAP3_seq_compiled L-l1dh_erm_region	TAATATTTCAAATCAATAAGGACAAAATAAGATTTAAAATTTAGACAATTT TAATATTTCAAATCAATAAGGACAAAATAAGATTTAAAATTTAGACAATTT *****
l1dh_erm_CAP3_seq_compiled L-l1dh_erm_region	CATCAAACCTATGTTATAATATTATTAAAGGAAAATACATATTTATTAGG CATCAAACCTATGTTATAATATTATTAAAGGAAAATACATATTTATTAGG *****
l1dh_erm_CAP3_seq_compiled L-l1dh_erm_region	AGGCGATGTAATGAGCAAGGTAGCAATAATAGGATCTGGTTTTGTAGGTG AGGCGATGTAATGAGCAAGGTAGCAATAATAGGATCTGGTTTTGTAGGTG *****
l1dh_erm_CAP3_seq_compiled L-l1dh_erm_region	CAACATCGGCATTTACGCTGGCATTAAAGTGGGACTGTGACAGATATCGTG CAACATCGGCATTTACGCTGGCATTAAAGTGGGACTGTGACAGATATCGTG *****
l1dh_erm_CAP3_seq_compiled L-l1dh_erm_region	CTGGTGGATTTAAACAAGGACAAGGCTATAGGCGATGCACTGGACATAAG CTGGTGGATTTAAACAAGGACAAGGCTATAGGCGATGCACTGGACATAAG *****
l1dh_erm_CAP3_seq_compiled L-l1dh_erm_region	CCATGGCATAACCGCTAATACAGCCTGTAAATGTGTATGCAGGTGACTACA CCATGGCATAACCGCTAATACAGCCTGTAAATGTGTATGCAGGTGACTACA *****
l1dh_erm_CAP3_seq_compiled L-l1dh_erm_region	AAGATGTGAAAGGCGCAGATGTAATAGTTGTGACAGCAGGTGCTGCTCAA AAGATGTGAAAGGCGCAGATGTAATAGTTGTGACAGCAGGTGCTGCTCAA *****
l1dh_erm_CAP3_seq_compiled L-l1dh_erm_region	AAGCCGGGAGAGACACGGCTTGACCTTGTAAGAAAAATACAGCCATATT AAGCCGGGAGAGACACGGCTTGACCTTGTAAGAAAAATACAGCCATATT *****
l1dh_erm_CAP3_seq_compiled L-l1dh_erm_region	TAAGTCCATGATACCTGAGCTTTTAAAGTACAATGACAAGGCCATATATT TAAGTCCATGATACCTGAGCTTTTAAAGTACAATGACAAGGCCATATATT *****
l1dh_erm_CAP3_seq_compiled L-l1dh_erm_region	TGATTGTGACAAATCCCGTAGATATACTGACGTACGTTACATACAAGATT TGATTGTGACAAATCCCGTAGATATACTGACGTACGTTACATACAAGATT *****
l1dh_erm_CAP3_seq_compiled L-l1dh_erm_region	TCTGGACTTCCATGGGGCAGAGTTTTGGTTCTGGCACCCTTCTTGACAG TCTGGACTTCCATGGGGCAGAGTTTTGGTTCTGGCACCCTTCTTGACAG *****

Fig. 3 (Continuação)

l1dh_erm_CAP3_seq_compiled L-l1dh_erm_region	CTCAAGGTTTAGATACCTTTTAAGCAAGGACTGCTGCAGGTCGATAAACC CTCAAGGTTTAGATACCTTTTAAGCAAGGACTGCTGCAGGTCGATAAACC *****
l1dh_erm_CAP3_seq_compiled L-l1dh_erm_region	CAGCGAACCATTTGAGGTGATAGGTAAGATTATACCGAGGTATGAAAACG CAGCGAACCATTTGAGGTGATAGGTAAGATTATACCGAGGTATGAAAACG *****
l1dh_erm_CAP3_seq_compiled L-l1dh_erm_region	AGAATTGGACCTTTACAGAATTACTCTATGAAGCGCCATATTTAAAAAGC AGAATTGGACCTTTACAGAATTACTCTATGAAGCGCCATATTTAAAAAGC *****
l1dh_erm_CAP3_seq_compiled L-l1dh_erm_region	TACCAAGACGAAGAGGATGAAGAGGATGAGGAGGCAGATTGCCTTGAATA TACCAAGACGAAGAGGATGAAGAGGATGAGGAGGCAGATTGCCTTGAATA *****
l1dh_erm_CAP3_seq_compiled L-l1dh_erm_region	TATTGACAATACTGATAAGATAATATATCTTTTATATAGAAGATATCGCC TATTGACAATACTGATAAGATAATATATCTTTTATATAGAAGATATCGCC *****
l1dh_erm_CAP3_seq_compiled L-l1dh_erm_region	GTATGTAAGGATTTTCAGGGGGCAAGGCATAGGCAGCGCGCTTATCAATAT GTATGTAAGGATTTTCAGGGGGCAAGGCATAGGCAGCGCGCTTATCAATAT *****
l1dh_erm_CAP3_seq_compiled L-l1dh_erm_region	ATCTATAGAATGGCAAAGCATAAAAACCTTGCATGGACTAATGCTTGAAA ATCTATAGAATGGCAAAGCATAAAAACCTTGCATGGACTAATGCTTGAAA *****
l1dh_erm_CAP3_seq_compiled L-l1dh_erm_region	CCCAGGACAATAACCTTATAGCTTGTAATTTCTATCATAAATGTGGTTTC CCCAGGACAATAACCTTATAGCTTGTAATTTCTATCATAAATGTGGTTTC *****
l1dh_erm_CAP3_seq_compiled L-l1dh_erm_region	AAAATCGGCTCCGTCGATACTATGTTTACGCCAACTTTGAAAACAACCTT AAAATCGGCTCCGTCGATACTATGTTTACGCCAACTTTGAAAACAACCTT *****
l1dh_erm_CAP3_seq_compiled L-l1dh_erm_region	TGAAAAAGCTGTTTCTGGTATTTAAGGTTTGAATGCAAGGAACAGTG TGAAAAAGCTGTTTCTGGTATTTAAGGTTTGAATGCAAGGAACAGTG *****
l1dh_erm_CAP3_seq_compiled L-l1dh_erm_region	AATTGGAGTTCGTCCTTGTATAAATTAGCTTCTTGGGGTATCTTTAAATAC AATTGGAGTTCGTCCTTGTATAAATTAGCTTCTTGGGGTATCTTTAAATAC *****
l1dh_erm_CAP3_seq_compiled L-l1dh_erm_region	TGTAGAAAAGAGGAAGGAAATAATAAATGGCGGATCCCATGAACAAAAT TGTAGAAAAGAGGAAGGAAATAATAAATGGCGGATCCCATGAACAAAAT *****
l1dh_erm_CAP3_seq_compiled L-l1dh_erm_region	ATAAAATATTCTCAAAACTTTTAAACGAGTGAAAAAGTACTCAACCAAAT ATAAAATATTCTCAAAACTTTTAAACGAGTGAAAAAGTACTCAACCAAAT *****

Fig. 3 (Continuação)

```

l1dh_erm_CAP3_seq_compiled      AATAAAACAATTGAATTTAAAAGAAACCGATACCGTTTACGAAATTGGAA
L-l1dh_erm_region              AATAAAACAATTGAATTTAAAAGAAACCGATACCGTTTACGAAATTGGAA
*****

l1dh_erm_CAP3_seq_compiled      CAGGTAAAGGGCATTTAACGACGAAACTGGCTAAAATAAGTAAACAGGTA
L-l1dh_erm_region              CAGGTAAAGGGCATTTAACGACGAAACTGGCTAAAATAAGTAAACAGGTA
*****

l1dh_erm_CAP3_seq_compiled      ACGTCTATTGAATTAGACAGTCATCTATTCAACTTATCGTCAGAAAAATT
L-l1dh_erm_region              ACGTCTATTGAATTAGACAGTCATCTATTCAACTTATCGTCAGAAAAATT
*****

l1dh_erm_CAP3_seq_compiled      AAACTGAATACTCGTGTCACTTTAATTCACCAAGATATTCACAGTTTC
L-l1dh_erm_region              AAACTGAATACTCGTGTCACTTTAATTCACCAAGATATTCACAGTTTC
*****

l1dh_erm_CAP3_seq_compiled      AATTCCCTAACAAACAGAGGTATAAAATGTTGGGAGTATTCCCTTACCAT
L-l1dh_erm_region              AATTCCCTAACAAACAGAGGTATAAAATGTTGGGAGTATTCCCTTACCAT
*****

l1dh_erm_CAP3_seq_compiled      TTAAGCACACAAATTATTA AAAAAGTGGTTTTTGAAGCCATGCGTCTGA
L-l1dh_erm_region              TTAAGCACACAAATTATTA AAAAAGTGGTTTTTGAAGCCATGCGTCTGA
*****

l1dh_erm_CAP3_seq_compiled      CATCTATCTGATTGTTGAAGAAGGATTCACAAGCGTACCTTGGATATTC
L-l1dh_erm_region              CATCTATCTGATTGTTGAAGAAGGATTCACAAGCGTACCTTGGATATTC
*****

l1dh_erm_CAP3_seq_compiled      ACCGAACACTAGGGTTGCTCTTGCACACTCAAGTCTCGATTGCAAAATTG
L-l1dh_erm_region              ACCGAACACTAGGGTTGCTCTTGCACACTCAAGTCTCGATTGCAAAATTG
*****

l1dh_erm_CAP3_seq_compiled      CTTAAGCTGCCAGCGGAATGCTTTTCATCCTAAACCAAAGTAAACAGTGT
L-l1dh_erm_region              CTTAAGCTGCCAGCGGAATGCTTTTCATCCTAAACCAAAGTAAACAGTGT
*****

l1dh_erm_CAP3_seq_compiled      CTTAATAAAAACCTACCCGCCATACCACAGATGTTCCAGATAAAATATTGGA
L-l1dh_erm_region              CTTAATAAAAACCTACCCGCCATACCACAGATGTTCCAGATAAAATATTGGA
*****

l1dh_erm_CAP3_seq_compiled      AGCTATATACGTACTTTGTTTCAAATGGGTCAATCGAGAATATCGTCAA
L-l1dh_erm_region              AGCTATATACGTACTTTGTTTCAAATGGGTCAATCGAGAATATCGTCAA
*****

l1dh_erm_CAP3_seq_compiled      CTGTTTACTAAAAATCAGTTTCATCAAGCAATGAAACACGCCAAAGTAAA
L-l1dh_erm_region              CTGTTTACTAAAAATCAGTTTCATCAAGCAATGAAACACGCCAAAGTAAA
*****

l1dh_erm_CAP3_seq_compiled      CAATTTAAGTACCGTTACTTATGAGCAAGTATTGCTATTTTTAATAGTT
L-l1dh_erm_region              CAATTTAAGTACCGTTACTTATGAGCAAGTATTGCTATTTTTAATAGTT
*****

```

Fig. 3 (Continuação)

```

11dh_erm_CAP3_seq_compiled      ATCTATTATTTAACGGGAGGAAATAATTCCTATGAGTCGCCTTTTGTA AAT
L-1dh_erm_region                ATCTATTATTTAACGGGAGGAAATAATTCCTATGAGTCGCCTTTTGTA AAT
*****

11dh_erm_CAP3_seq_compiled      TGGAAAGTTACACGTTACTAAAGGGAATTCCTAGACAGAGTTTGCAGCA
L-1dh_erm_region                TGGAAAGTTACACGTTACTAAAGGGAATTCCTAGACAGAGTTTGCAGCA
*****

11dh_erm_CAP3_seq_compiled      TGGAGCATAACAAACATATCGGGTATATCATTTAATGAGTACTGCAGCAT
L-1dh_erm_region                TGGAGCATAACAAACATATCGGGTATATCATTTAATGAGTACTGCAGCAT
*****

11dh_erm_CAP3_seq_compiled      ATGCGGACGCGTCTGCAACACAAATTTTCAGAAAGGAAGTAGAAGAAGAAG
L-1dh_erm_region                ATGCGGACGCGTCTGCAACACAAATTTTCAGAAAGGAAGTAGAAGAAGAAG
*****

11dh_erm_CAP3_seq_compiled      TCGTAAATGCTGCTTACAAGATAATAGACAAAAAAGGTGCTACATACTAT
L-1dh_erm_region                TCGTAAATGCTGCTTACAAGATAATAGACAAAAAAGGTGCTACATACTAT
*****

11dh_erm_CAP3_seq_compiled      GCTGTGGCAGTTGCAGTAAGAAGGATTGTGGAGTGCATCTTAAGAGATGA
L-1dh_erm_region                GCTGTGGCAGTTGCAGTAAGAAGGATTGTGGAGTGCATCTTAAGAGATGA
*****

11dh_erm_CAP3_seq_compiled      AAATTCATCCTCACAGTATCATCTCCATTAATGGACAGTACGGCGTGA
L-1dh_erm_region                AAATTCATCCTCACAGTATCATCTCCATTAATGGACAGTACGGCGTGA
*****

11dh_erm_CAP3_seq_compiled      AAGATGTTTCATTAAGCTTGCCATCTATCGTAGGCAGGAATGGCGTTGCC
L-1dh_erm_region                AAGATGTTTCATTAAGCTTGCCATCTATCGTAGGCAGGAATGGCGTTGCC
*****

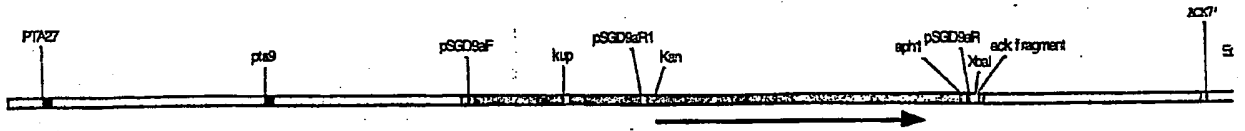
11dh_erm_CAP3_seq_compiled      AGGATTTTGGACTTGCCTTTATCTGACGAAGAAGTGGAGAAGTTTAGGCA
L-1dh_erm_region                AGGATTTTGGACTTGCCTTTATCTGACGAAGAAGTGGAGAAGTTTAGGCA
*****

11dh_erm_CAP3_seq_compiled      TTCAGCAAGTGTTCATGGCAGATGTCATAAAACAATTAGATATATAATCAA
L-1dh_erm_region                TTCAGCAAGTGTTCATGGCAGATGTCATAAAACAATTAGATATATAATCAA
*****

11dh_erm_CAP3_seq_compiled      ATTATGTTGGGAGGCT-----
L-1dh_erm_region                ATTATGTTGGGAGGCTTCACATATGTGTGGTGGAGGCCTCTTNNNNNNAT
*****

```

Fig. 4



Alinhamento de seqüência – lócus pta-ack

Linha 1: Seqüência compilada a partir da cepa ALK1

Linha 2: Seqüência esperada com base na seqüência pta-ack e vetor suicida pSGD9

Consenso chave

* - único, resíduo totalmente conservado

- nenhum consenso

CLUSTAL W (1.81) múltiplo alinhamento de seqüência

```

pta_kan_ack_CAP3_complied -----
pta_kan_ack_region          ATAATAATGCTGCTTCTGTCTTGACCATTTGTCTATAATAGAAGGAATG

pta_kan_ack_CAP3_complied   -AGCGCTGTACGAAATTGCCACTCATTACAGCTACGACAAAGTCTGC'TTT
pta_kan_ack_region          CCGCGCTGTACGAAATTGCCACTCATTACAGCTACGACAAAGTCTGC'TTT
                              *****

pta_kan_ack_CAP3_complied   TGTCA'TTCCATAGACTTTT'TATGTGATATACGTGCCCAT'TGTGAAGTG
pta_kan_ack_region          TGTCA'TTCCATAGACTTTT'TATGTGATATACGTGCCCAT'TGTGAAGTG
                              *****

pta_kan_ack_CAP3_complied   GATTGTATTCTACAAT'AAACCTAATACGCTCATAATATGCGCCTTTCTA
pta_kan_ack_region          GATTGTATTCTACAAT'AAACCTAATACGCTCATAATATGCGCCTTTCTA
                              *****

pta_kan_ack_CAP3_complied   AAAAA'TTATTAATTGTACTTATTATTTTATAAAAAATATGTTAAAATGTA
pta_kan_ack_region          AAAAA'TTATTAATTGTACTTATTATTTTATAAAAAATATGTTAAAATGTA
                              *****

pta_kan_ack_CAP3_complied   AAATGTGTATACAATATATTTCTTCTTAGTAAGAGGAATGTATAAAAAATA
pta_kan_ack_region          AAATGTGTATACAATATATTTCTTCTTAGTAAGAGGAATGTATAAAAAATA
                              *****

pta_kan_ack_CAP3_complied   AATATTTTAAAGGAAGGGACGATCTTATGAGCATTATTCAAAACATCATT
pta_kan_ack_region          AATATTTTAAAGGAAGGGACGATCTTATGAGCATTATTCAAAACATCATT
                              *****
    
```

Fig. 4 (Continuação)

pta_kan_ack_CAP3_complied pta_kan_ack_region	GAAAAAGCTAAAAGCGATAAAAAGAAAATTGTTCTGCCAGAAGGTGCAGA GAAAAAGCTAAAAGCGATAAAAAGAAAATTGTTCTGCCAGAAGGTGCAGA *****
pta_kan_ack_CAP3_complied pta_kan_ack_region	ACCCAGGACATTAAGCTGCTGAAATAGTTTTAAAAGAAGGGATTGCAG ACCCAGGACATTAAGCTGCTGAAATAGTTTTAAAAGAAGGGATTGCAG *****
pta_kan_ack_CAP3_complied pta_kan_ack_region	ATTTAGTGCTTCTTGGAATGAAGATGAGATAAGAAATGCTGCAAAAGAC ATTTAGTGCTTCTTGGAATGAAGATGAGATAAGAAATGCTGCAAAAGAC *****
pta_kan_ack_CAP3_complied pta_kan_ack_region	TTGGACATATCCAAAGCTGAAATCATTGACCCTGTAAAGTCTGAAATGTT TTGGACATATCCAAAGCTGAAATCATTGACCCTGTAAAGTCTGAAATGTT *****
pta_kan_ack_CAP3_complied pta_kan_ack_region	TGATAGGTATGCTAATGATTTCTATGAGTTAAGGAAGAACAAGGAATCA TGATAGGTATGCTAATGATTTCTATGAGTTAAGGAAGAACAAGGAATCA *****
pta_kan_ack_CAP3_complied pta_kan_ack_region	CGTTGGA AAAAGCCAGAGAAAACAATCAAGGATAATATCTATTTGGATGT CGTTGGA AAAAGCCAGAGAAAACAATCAAGGATAATATCTATTTGGATGT *****
pta_kan_ack_CAP3_complied pta_kan_ack_region	ATGATGGTTAAAGAAGGTTATGCTGATGGATTGGTATCTGGCGCTATTCA ATGATGGTTAAAGAAGGTTATGCTGATGGATTGGTATCTGGCGCTATTCA *****
pta_kan_ack_CAP3_complied pta_kan_ack_region	TGCTACTGCAGATTTATTAAGACCTGCATTTTCAGATAATTA AACGGCTC TGCTACTGCAGATTTATTAAGACCTGCATTTTCAGATAATTA AACGGCTC *****
pta_kan_ack_CAP3_complied pta_kan_ack_region	CAGGAGCAAAGATAGTATCAAGCTTTTTTATAATGGAAGTGCCTAATTGT CAGGAGCAAAGATAGTATCAAGCTTTTTTATAATGGAAGTGCCTAATTGT *****
pta_kan_ack_CAP3_complied pta_kan_ack_region	GAATATGGTGAAAATGGTGTATTCTTGTTGCTGATTGTGCGGTCAACCC GAATATGGTGAAAATGGTGTATTCTTGTTGCTGATTGTGCGGTCAACCC *****
pta_kan_ack_CAP3_complied pta_kan_ack_region	ATCGCCTAATGCAGAAGAACTTGCTTCTATTGCCGTACAATCTGCTAATA ATCGCCTAATGCAGAAGAACTTGCTTCTATTGCCGTACAATCTGCTAATA *****
pta_kan_ack_CAP3_complied pta_kan_ack_region	CTGCAAAGAATTTGTTGGGCTTTGAACCAAAGTTGCCATGCTATCATTT CTGCAAAGAATTTGTTGGGCTTTGAACCAAAGTTGCCATGCTATCATTT *****
pta_kan_ack_CAP3_complied pta_kan_ack_region	TCTACAAAAGGTAGTGCATCACATGAATTAGTAGATAAAGTAAGAAAAGC TCTACAAAAGGTAGTGCATCACATGAATTAGTAGATAAAGTAAGAAAAGC *****

Fig. 4 (Continuação)

pta_kan_ack_CAP3_complied pta_kan_ack_region	GACAGAGATAGCAAAAAGAATTGATGCCAGATGTTGCTATCGACGGTGAAT GACAGAGATAGCAGAAGAATTGATGCCAGATGTTGCTATTCGACGGTGAAT *****
pta_kan_ack_CAP3_complied pta_kan_ack_region	TGCAATTGGATGCTGCTCTTGTAAAGAAGTTGCAGAGCTAAAAGCGCCG TGCAATTGGATGCTGCTCTTGTAAAGAAGTTGCAGAGCTAAAAGCGCCG *****
pta_kan_ack_CAP3_complied pta_kan_ack_region	GGAAGCAAAGTTGCGGGATGTGCAAATGTGCTTATATTCCCTGATTTACA GGAAGCAAAGTTGCGGGATGTGCAAATGTGCTTATATTCCCTGATTTACA *****
pta_kan_ack_CAP3_complied pta_kan_ack_region	AGCTGGTAATATAGGATATAAGCTTGTACAGAGGTTAGCTAAGGCAAATG AGCTGGTAATATAGGATATAAGCTTGTACAGAGGTTAGCTAAGGCAAATG *****
pta_kan_ack_CAP3_complied pta_kan_ack_region	CAATTGGACCTATAACACAAGGAATGGGTGCAGGTCGATAAACCCAGCGA CAATTGGACCTATAACACAAGGAATGGGTGCAGGTCGATAAACCCAGCGA *****
pta_kar_ack_CAP3_complied pta_kan_ack_region	ACCATTTGAGGTGATAGGTAAGATTATACCGAGGTATGAAAACGAGAATT ACCATTTGAGGTGATAGGTAAGATTATACCGAGGTATGAAAACGAGAATT *****
pta_kan_ack_CAP3_complied pta_kar_ack_region	GGACCTTTACAGAATTACTCTATGAAGCGCCATATTTAAAAGCTACCAA GGACCTTTACAGAATTACTCTATGAAGCGCCATATTTAAAAGCTACCAA *****
pta_kan_ack_CAP3_complied pta_kan_ack_region	GACGAAGAGGATGAAGAGGATGAGGAGGCAGATTGCCTTGAATATATTGA GACGAAGAGGATGAAGAGGATGAGGAGGCAGATTGCCTTGAATATATTGA *****
pta_kar_ack_CAP3_complied pta_kan_ack_region	CAATACTGATAAGATAATATATCTTTTATATAGAAGATATCGCCGTATGT CAATACTGATAAGATAATATATCTTTTATATAGAAGATATCGCCGTATGT *****
pta_kan_ack_CAP3_complied pta_kan_ack_region	AAGGATTTGAGGGGGCAAGGCATAGGCAGCGCGCTTATCAATATATCTAT AAGGATTTGAGGGGGCAAGGCATAGGCAGCGCGCTTATCAATATATCTAT *****
pta_kan_ack_CAP3_complied pta_kan_ack_region	AGAATGGGCAAAGCATAAAAACCTTGCATGGACTAATGCTTGAACCCAGG AGAATGGGCAAAGCATAAAAACCTTGCATGGACTAATGCTTGAACCCAGG *****
pta_kan_ack_CAP3_complied pta_kan_ack_region	ACAATAACCTTATAGCTTGTAAATCTATCATAATGTGGTTTCAAATC ACAATAACCTTATAGCTTGTAAATCTATCATAATGTGGTTTCAAATC *****
pta_kan_ack_CAP3_complied pta_kan_ack_region	GGCTCCGTCGATACATGTTTATACGCCAACTTTGAAAACAACCTTTGAAA GGCTCCGTCGATACATGTTTATACGCCAACTTTGAAAACAACCTTTGAAA *****

Fig. 4 (Continuação)

pta_kan_ack_CAP3_complied pta_kan_ack_region	AGCTGTTTTCTGGTATTTAAGGTTTTAGAATGCAAGGAACAGTGAATTGG AGCTGTTTTCTGGTATTTAAGGTTTTAGAATGCAAGGAACAGTGAATTGG *****
pta_kan_ack_CAP3_complied pta_kan_ack_region	AGTTCGTCTTGTATAATTAGCTTCTTGGGGTATCTTTAAATACTGTAGA AGTTCGTCTTGTATAATTAGCTTCTTGGGGTATCTTTAAATACTGTAGA *****
pta_kan_ack_CAP3_complied pta_kan_ack_region	AAAGAGGAAGGAAATAATAAATGGCTAAAATGAGAATATCACCGGAATTG AAAGAGGAAGGAAATAATAAATGGCTAAAATGAGAATATCACCGGAATTG *****
pta_kan_ack_CAP3_complied pta_kan_ack_region	AAAAAATGATCGAAAAATACCGCTGCGTAAAAGATACGGAAGGAATGTC AAAAAATGATCGAAAAATACCGCTGCGTAAAAGATACGGAAGGAATGTC *****
pta_kan_ack_CAP3_complied pta_kan_ack_region	TCCTGCTAAGGTATATAAGCTGGTGGGAGAAAATGAAACCTATATTTAA TCCTGCTAAGGTATATAAGCTGGTGGGAGAAAATGAAACCTATATTTAA *****
pta_kan_ack_CAP3_complied pta_kan_ack_region	AAATGACGGACAGCCGGTATAAAGGGACCACCTATGATGTGGAACGGGAA AAATGACGGACAGCCGGTATAAAGGGACCACCTATGATGTGGAACGGGAA *****
pta_kan_ack_CAP3_complied pta_kan_ack_region	AAGGACATGATGCTATGGCTGGAAGGAAAGCTGCCTGTTCCAAGGTCCT AAGGACATGATGCTATGGCTGGAAGGAAAGCTGCCTGTTCCAAGGTCCT *****
pta_kan_ack_CAP3_complied pta_kan_ack_region	GCACCTTGAACGGCATGATGGCTGGAGCAATCTGCTCATGAGTGAGGCCG GCACCTTGAACGGCATGATGGCTGGAGCAATCTGCTCATGAGTGAGGCCG *****
pta_kan_ack_CAP3_complied pta_kan_ack_region	ATGGCGTCCTTTGCTCGGAAGAGTATGAAGATGAACAAAGCCCTGAAAAG ATGGCGTCCTTTGCTCGGAAGAGTATGAAGATGAACAAAGCCCTGAAAAG *****
pta_kan_ack_CAP3_complied pta_kan_ack_region	ATTATCGAGCTGTATGCGGAGTGCATCAGGCTCTTTCACTCCATCGACAT ATTATCGAGCTGTATGCGGAGTGCATCAGGCTCTTTCACTCCATCGACAT *****
pta_kan_ack_CAP3_complied pta_kan_ack_region	ATCGGATTGTCCCTATACGAATAGCTTAGACAGCCGCTTAGCCGAATTGG ATCGGATTGTCCCTATACGAATAGCTTAGACAGCCGCTTAGCCGAATTGG *****
pta_kan_ack_CAP3_complied pta_kan_ack_region	ATTACTTACTGAATAACGATCTGGACGATGTGGATTGCGAAAACCTGGGAA ATTACTTACTGAATAACGATCTGGCCGATGTGGATTGCGAAAACCTGGGAA *****
pta_kan_ack_CAP3_complied pta_kan_ack_region	GAAGACACTCCATTTAAAGATCCGCGGAGCTGTATGATTTTTAAAGAC GAAGACACTCCATTTAAAGATCCGCGGAGCTGTATGATTTTTAAAGAC *****

Fig. 4 (Continuação)

pta_kan_ack_CAP3_complied pta_kan_ack_region	GGAAAAGCCCCGAAGAGGAAC TTGTCTTTTCCCACGGCGACCTGGGAGACA GGAAAAGCCCCGAAGAGGAAC TTGTCTTTTCCCACGGCGACCTGGGAGACA *****
pta_kan_ack_CAP3_complied pta_kan_ack_region	GCAACATCTTTGTGAAAGATGGCAAAGTAAGTGGCTTTATTTGATCTTGGG GCAACATCTTTGTGAAAGATGGCAAAGTAAGTGGCTTTATTTGATCTTGGG *****
pta_kan_ack_CAP3_complied pta_kan_ack_region	AGAAGCGGCAGGGCCGGACAAGTGGTATGACATTGCCTTCTGCGTCCGGTC AGAAGCGGCAGGGCCGGACAAGTGGTATGACATTGCCTTCTGCGTCCGGTC *****
pta_kan_ack_CAP3_complied pta_kan_ack_region	GATCAGGGAGGATATCGGGGAAGAACAGTATGTCGAGCTATTTTTTACTG GATCAGGGAGGATATCGGGGAAGAACAGTATGTCGAGCTATTTTTTACTG *****
pta_kan_ack_CAP3_complied pta_kan_ack_region	TACTGGGGATCAAGCCTGATTGGGAGAAAATAAAAAATATATTTTACTG TACTGGGGATCAAGCCTGATTGGGAGAAAATAAAAAATATATTTTACTG ***** * *****
pta_kan_ack_CAP3_complied pta_kan_ack_region	GATGAATTGTTTTAGTACCTAGATTTAGATGTC TAAAAAGCTTTAACTAC GATGAATTGTTTTAGTACCTAGATTTAGATGTC TAAAAAGCT----- *****
pta_kan_ack_CAP3_complied pta_kan_ack_region	AAGCTTTTTAGACATCTAATCTTTTCTGAAGTACATCCGCAACTGTCCAT -----TTTTAGACATCTAATCTTTTCTGAAGTACATCCGCAACTGTCCAT *****
pta_kan_ack_CAP3_complied pta_kan_ack_region	ACTCTGATGTTTTATATCTTTTCTAAAAGTTTCGNCTAGATAGGGGTCCCG ACTCTGATGTTTTATATCTTTTCTAAAAGTTTCGCTAGATAGGGGTCCCG ***** *****
pta_kan_ack_CAP3_complied pta_kan_ack_region	AGCGCCTACGAGGAATTTGTATCGACTCTAGAGCATAGAATATAGCTCCA AGCGCCTACGAGGAATTTGTATCGACTCTAGAGCATAGAAT-TAGCTCCA *****
pta_kan_ack_CAP3_complied pta_kan_ack_region	CTGCACAATCCTGCTAATATAGAAGGAATTAAGCTTGCCAGCAAATCAT CTGCACAATCCTGCTAATATAGAAGGAATTAAGCTTGCCAGCAAATCAT *****
pta_kan_ack_CAP3_complied pta_kan_ack_region	GCCAAACGTTCCAATGGTGGCGGTATTTGATACAGCCTTTCATCAGACAA GCCAAACGTTCCAATGGTGGCGGTATTTGATACAGCCTTTCATCAGACAA *****
pta_kan_ack_CAP3_complied pta_kan_ack_region	TGCCTGATTATGCATATCTTTATCCAATACCTTATGAATACTACACAAAG TGCCTGATTATGCATATCTTTATCCAATACCTTATGAATACTACACAAAG *****
pta_kan_ack_CAP3_complied pta_kan_ack_region	TACAGGATTAGAAGATATGGATTTTCATGGCACATCGCATAAATATGTTTC TACAGGATTAGAAGATATGGATTTTCATGGCACATCGCATAAATATGTTTC *****

Fig. 4 (Continuação)

pta_kan_ack_CAP3_complied	AAATAGGGCTGCAGAGATTTTGAATAAACCTATTGAAGATTGAAAATCA
pta_kan_ack_region	AAATAGGGCTGCAGAGATTTTGAATAAACCTATTGAAGATTGAAAATCA

pta_kan_ack_CAP3_complied	TAACTTGTTCATCTTGGAAATGGCTCCAGCATTGCTGCTGTCAAATATGGT
pta_kan_ack_region	TAACTTGTTCATCTTGGAAATGGCTCCAGCATTGCTGCTGTCAAATATGGT

pta_kan_ack_CAP3_complied	AAATCAATTGACACAAGCATGGGATTTACACCATTAGAAGGTTTGGCTAT
pta_kan_ack_region	AAATCAATTGACACAAGCATGGGATTTACACCATTAGAAGGTTTGGCTAT

pta_kan_ack_CAP3_complied	GGGTACACGATCTGGAAGCATAGACCCATCCATCATTTTCGTATCTTATGG
pta_kan_ack_region	GGGTACACGATCTGGAAGCATAGACCCATCCATCATTTTCGTATCTTATGG

pta_kan_ack_CAP3_complied	AAAAAGAAAATATAAGCGCTGAAGAAGTAGTAAATATATTTAAATAAAAAA
pta_kan_ack_region	AAAAAGAAAATATAAGCGCTGAAGAAGTAGTAAATATATTTAAATAAAAAA

pta_kan_ack_CAP3_complied	TCTGGTGTTTACGGTATTTTCAGGAATAAGCAGCGATTTTAGAGACTTAGA
pta_kan_ack_region	TCTGGTGTTTACGGTATTTTCAGGAATAAGCAGCGATTTTAGAGACTTAGA

pta_kan_ack_CAP3_complied	AGATGCCGCCTTTAAAAATGGAGATGAAAGAGCTCAGTTGGCTTTAAATG
pta_kan_ack_region	AGATGCCGCCTTTAAAAATGGAGATGAAAGAGCTCAGTTGGCTTTAAATG

pta_kan_ack_CAP3_complied	TGTTTGCATATCGA-GTAAAGAAGACGATTTGGCGCTTATGCAGCAGACTA
pta_kan_ack_region	TGTTTGCATATCGAAGTAAAGAAGACGATTTGGCGCTTATGCAGCAG-CTA
	***** *****
pta_kan_ack_CAP3_complied	TGGGAGGCGTCGATGTCATTGTATTTACAGCAGGTGTGGGTTGGAAAATG
pta_kan_ack_region	TGGGAGGCGTCGATGTCATTGTATTTACAGCAGGTGTGGT--GAAAATG
	***** *****
pta_kan_ack_CAP3_complied	GGTCCA
pta_kan_ack_region	GTCC--

14/16

14/16

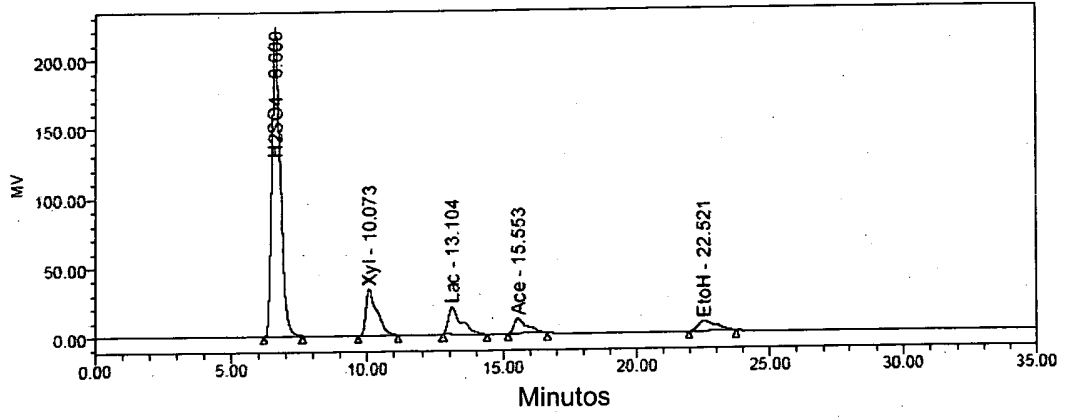


Fig. 5

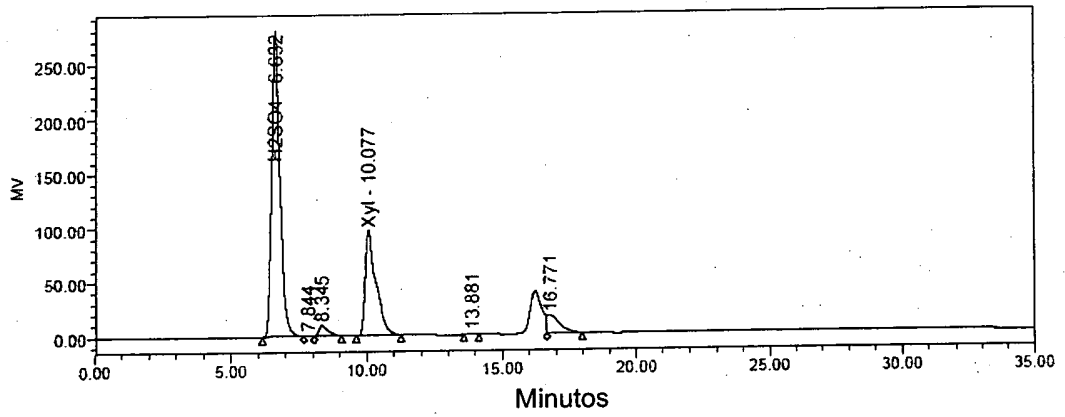


Fig. 6

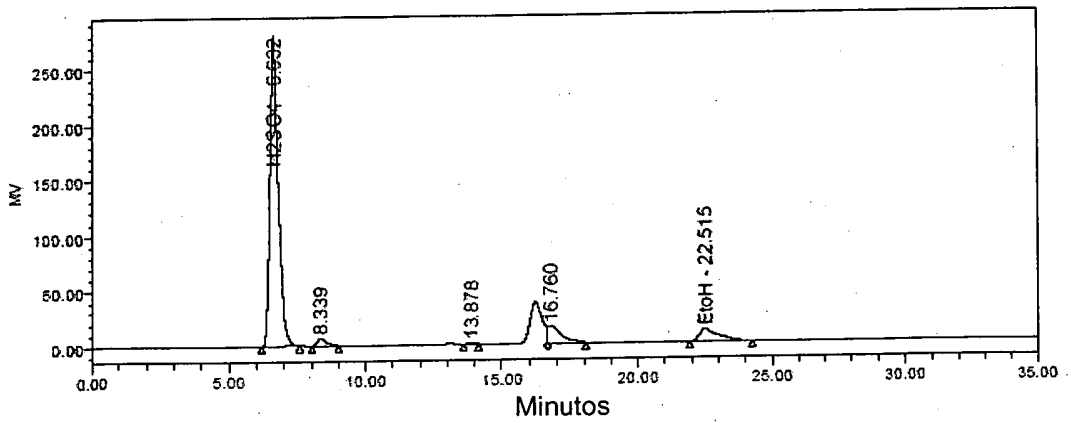


Fig. 7

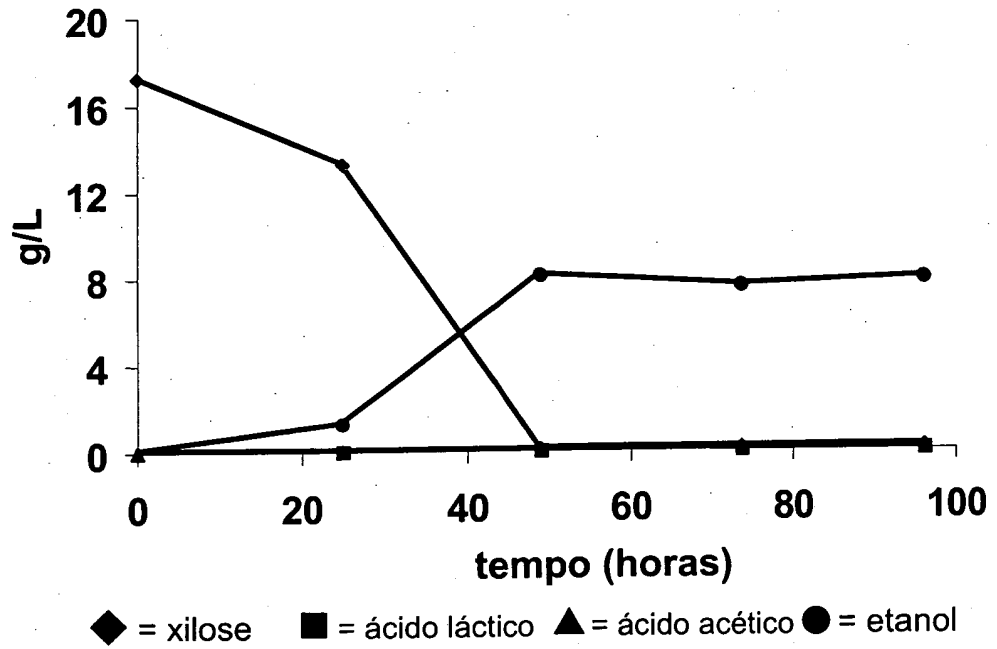


Fig. 8

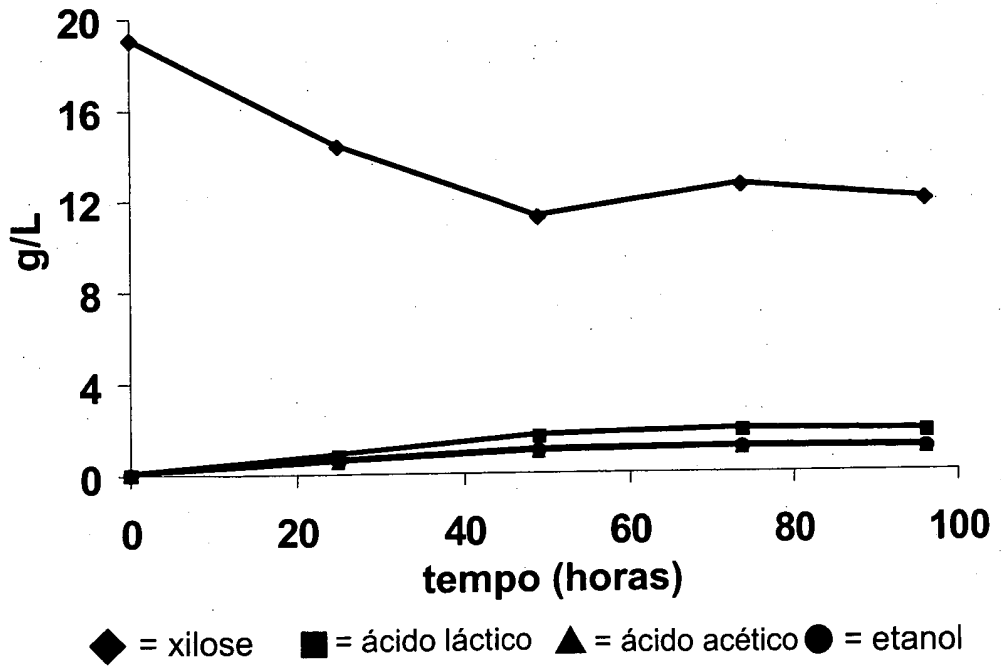


Fig. 9

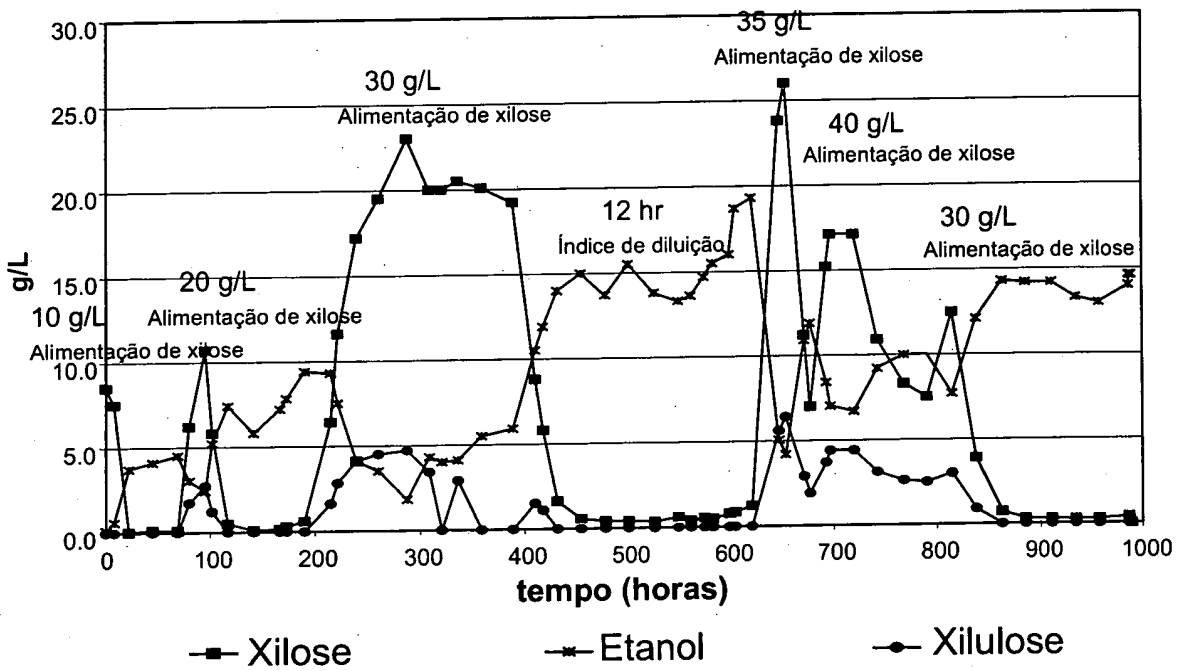


Fig. 10

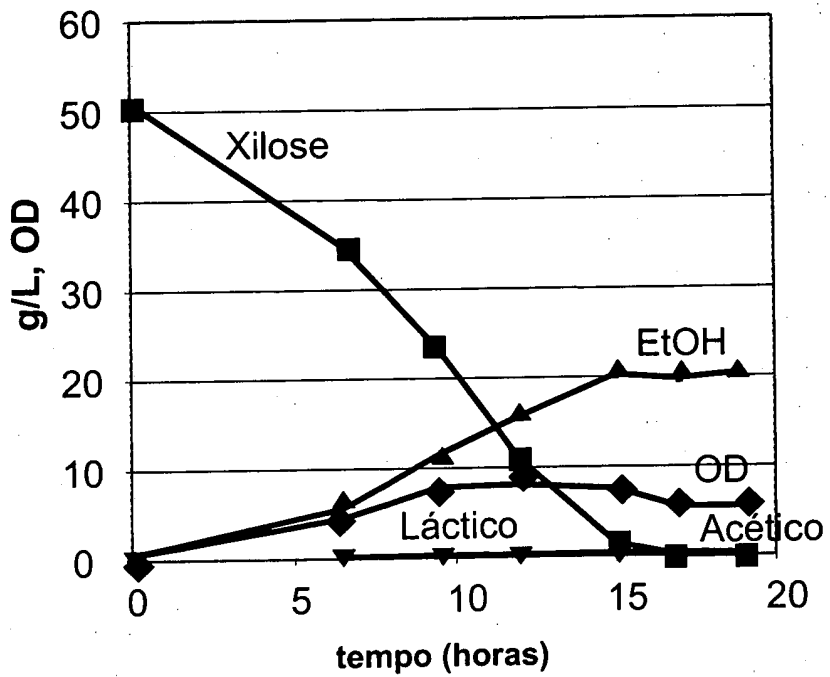


Fig. 11

RESUMO

Patente de Invenção: "**ORGANISMOS TERMOFÍLICOS PARA CONVERSÃO DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA EM ETANOL**".

A presente invenção refere-se a organismos termofílicos mutantes que consomem uma variedade de substratos derivados de biomassa. São descritas aqui, cepas de *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* com expressão eliminada de fosfotransacetilase e acetato quinase. Adicionalmente, a cepa ALK1 foi produzida por recombinação homóloga sítio-dirigida para arrasar tanto a produção de ácido acético quanto a de ácido láctico. Cultura contínua envolvendo um estímulo da concentração de substrato leva a evolução de ALK1, e a formação de uma cepa mais robusta designada ALK2. Ambos os organismos produzem rendimentos de etanol quase teóricos sem expressar piruvato decarboxilase.