



**(11) BR 112013009552-0 B1**

**(22) Data do Depósito:** 29/09/2011

**(45) Data de Concessão:** 24/04/2025

**República Federativa do Brasil**

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,  
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

---

**(54) Título:** MICROORGANISMO RECOMBINANTE QUE PRODUZ 1-BUTANOL E MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE 1-BUTANOL

**(51) Int.Cl.:** C12P 7/16; C12N 15/74; C12R 1/02; C07C 31/12; C12P 7/52; (...).

**(30) Prioridade Unionista:** 16/03/2011 US 13/049,263; 22/10/2010 US 61/405,871.

**(73) Titular(es):** LANZATECH NZ, INC..

**(72) Inventor(es):** MICHAEL KOEPKE; FUNG-MIN LIEW; SEAN DENNIS SIMPSON.

**(86) Pedido PCT:** PCT NZ2011000203 de 29/09/2011

**(87) Publicação PCT:** WO 2012/053905 de 26/04/2012

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 19/04/2013

**(57) Resumo:** PRODUÇÃO DE BUTANOL A PARTIR DE MONÓXIDO DE CARBONO POR UM MICRO-ORGANISMO RECOMBINANTE. A invenção refere-se, de modo geral, a novos micro-organismos geneticamente modificados capazes de utilizar CO para produzir 1-butanol e/ou um precursor do mesmo, metiltransferases e novos ácidos nucleicos que codificam a mesma, métodos de produção de micro-organismos geneticamente modificados utilizando as referidos novas metiltransferases e métodos de produção de 1-butanol e/ou um precursor do mesmo por meio de fermentação microbiana.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"MICRO-ORGANISMO RECOMBINANTE QUE PRODUZ 1-BUTANOL E MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE 1-BUTANOL"**.

CAMPO

5 A presente invenção refere-se a métodos para a produção de biocombustíveis por meio de fermentação microbiana e micro-organismos geneticamente modificados adequados para uso em tais métodos.

ANTECEDENTES

10 Butanol é um produto químico importante com uma ampla faixa de usos industriais que tem uma produção mundial de 4,5-5,5 milhões de toneladas por ano. Ele é usado como um precursor para a produção de ésteres de acrilato e metacrilato (usados em revestimentos, plásticos, têxteis, adesivos, etc.), glicol éteres (revestimentos, componentes eletrônicos) e acetato de butila (tintas, revestimentos, flavorizantes de fruta sintéticos), bem  
15 como butilaminas (produção de pesticidas e produtos farmacêuticos) e resinas de amina. Ele também tem uso direto como um solvente (em tinta, corantes, etc.), um agente de extração (para a produção de fármacos e substâncias naturais, tais como alcaloides, antibióticos, hormônios e vitaminas) e em fluidos de degelo, cosméticos e cromatografia.

20 Butanol também tem potencial como um biocombustível de segunda geração e, neste contexto, é referido como Biobutanol (Köpke & Dürre, 2010). Ele tem propriedades similares à gasolina e propriedades superiores ao etanol. Especificamente, ele tem alta octanagem em virtude de maior densidade de energia, pode ser misturado com a gasolina em qualquer con-  
25 centração (enquanto que o etanol pode ser misturado apenas até 85%) e não é higroscópico ou corrosivo.

Biocombustíveis para transporte são substitutos atraentes para a gasolina e são combustíveis que entram rapidamente no mercado como misturas de baixa concentração. Biocombustíveis, derivados de fontes vegetais  
30 naturais, são mais ambientalmente sustentáveis do que aqueles derivados de recursos fósseis (tal como gasolina), seu uso permitindo uma redução nos níveis do assim denominado gás dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) fóssil que é

liberado na atmosfera como um resultado de combustão de combustível. Além disso, biocombustíveis podem ser produzidos localmente em muitas localidades e podem atuar para reduzir a dependência de recursos de energia fóssil importada.

5                   A grande maioria dos biocombustíveis é produzida via processos de fermentação baseados em levedura tradicionais que usam carboidratos derivados de culturas como a principal fonte de carbono e são conhecidos como biocombustíveis de primeira geração. Contudo, estas culturas são re-  
10                   queridas para alimentação e muitas culturas também requerem altos insu-  
mos agrícolas na forma de fertilizantes. Estas limitações significam que bio-  
combustíveis de primeira geração não são considerados sustentáveis e as  
reduções de gás de efeito estufa que podem ser obtidas são limitadas. O  
objetivo de biocombustíveis secundários é o uso sustentável de partes não  
15                   destinadas à alimentação de culturas atuais ou outros resíduos industriais  
para reduzir as emissões de gás de efeito estufa e reduzir a dependência de  
combustíveis fósseis.

                  Produção recente de 1-butanol tem sido principalmente por meio de oxo síntese (Weißermel & Arpe, 2003). Petroquímicos, incluindo petróleo bruto, são craqueados para formar propileno, o qual é usado durante a oxo  
20                   síntese. No entanto, o processo de síntese requer o uso de recursos naturais não renováveis, bem como sofre pelo fato de ser dispendioso e não específico quanto aos produtos formados.

                  Butanol também pode ser produzido através de métodos de produção biológicos, o mais comum sendo a fermentação de Acetona-Butanol-  
25                   Etanol (ABE), a qual tem sido usada industrialmente desde 1913 (Köpke & Dürre, 2010). Este método tem o subproduto indesejável de acetona, o qual é usualmente produzido em cerca de metade do volume de butanol o qual, portanto, reduz substancialmente o rendimento. Adicionalmente, este método de fermentação é limitado pela toxicidade do butanol para o micro-  
30                   organismo, resultando no crescimento sendo quase completamente inibido em concentrações tão baixas de butanol quanto 1,5% (Köpke e Dürre 2010). Além disso, fermentação ABE usa açúcar de milho, amido, cassava e cana-

de-açúcar como matérias-primas. Isso resulta no uso indesejável de terras aráveis para produzir combustível em vez de alimento. Isto também pode agravar os problemas relacionados ao desmatamento e desertificação.

5 Apenas alguns organismos são conhecidos por produzir naturalmente butanol e nenhum destes produz butanol em um elevado rendimento a partir de fontes abundantes (tal como monóxido de carbono - CO). Dois organismos conhecidos por produzir naturalmente butanol a partir de CO são *Butyribacterium methylotrophicum* (o qual sintetiza apenas traços de butanol (Heiskanen *et al.*, 2007)) e *Clostridium carboxidivorans* (o qual produz baixos  
10 rendimentos de 1-butanol como um subproduto aos principais produtos de fermentação de etanol e acetato (Liou *et al.*, 2005)).

Uma série de organismos foi geneticamente modificada para produzir 1-butanol, incluindo *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pseudomonas putida* ou *Lactobacillus brevis*. No entanto, todos esses  
15 organismos ainda dependem de açúcar como matéria-prima (Köpke & Dürre, 2010). Apesar de mais de 250 espécies de *Clostridium* serem conhecidas, apenas algumas são geneticamente acessíveis. Não há competência natural (absorção de DNA extracelular a partir do ambiente da célula) conhecida em *Clostridia* e eletrotransformação ou conjugação são os únicos métodos dis-  
20 poníveis para transformação. Estas questões representam dificuldades significativas na transformação eficaz de espécies *Clostridium*. A maioria dos *Clostridia* tem um ou mais sistemas de restrição/metilação para proteger contra DNA estranho e de fago, o que significa que a transformação é particularmente difícil e imprevisível.

25 Detalhes bibliográficos das publicações mencionadas aqui são compilados ao final da descrição.

É um objetivo da invenção superar um ou mais inconvenientes da técnica anterior ou pelo menos fornecer ao público uma alternativa útil para tecnologias conhecidas.

### 30 SUMÁRIO DA INVENÇÃO

De acordo com a invenção, descobriu-se que um micro-organismo geneticamente modificado é capaz de usar CO para produzir 1-

butanol ou um precursor do mesmo como o principal produto de fermentação.

Em um primeiro aspecto, a invenção fornece um micro-organismo recombinante acetogênico carboxitrófico que produz 1-butanol e/ou um precursor do mesmo como o principal produto de fermentação.

Em um aspecto relacionado, a invenção fornece um micro-organismo recombinante acetogênico que é capaz de produzir 1-butanol e/ou um precursor do mesmo por meio de fermentação de um substrato que compreende CO em uma concentração maior do que aproximadamente 1 mM ou 0,075 g/l por litro de caldo de fermentação.

De preferência, o micro-organismo compreende ácidos nucleicos exógenos adaptados para expressar uma ou mais enzimas na via de biossíntese de butanol.

Em uma modalidade, a um ou mais enzimas são escolhidas do grupo que consiste em:

Tiolase

de-hidrogenase de 3-hidroxi-butiril-CoA

Crotonase/hidratase de crotonil-CoA

De-hidrogenase de butiril-CoA

Flavoproteína A de Transferência de Elétrons

Flavoproteína B de Transferência de Elétrons

De preferência, o micro-organismo compreende um ou mais ácidos nucleicos exógenos que codificam uma ou mais das enzimas.

De preferência, o um ou mais ácidos nucleicos que codificam uma ou mais enzimas são escolhidos de ácidos nucleicos SEQ ID NO. 1 a SEQ ID NO. 6 ou variantes funcionalmente equivalentes das mesmas.

De preferência, o micro-organismo compreende um ou mais ácidos nucleicos exógenos que codificam cada uma de tiolase, de-hidrogenase de 3-hidroxi-butiril-CoA, Crotonase, de-hidrogenase de butiril-CoA, Flavoproteína de Transferência de Elétrons A e Flavoproteína de Transferência de Elétrons B.

De preferência, o micro-organismo compreende um plasmídeo

que codifica uma ou mais das mesmas ou, de preferência, cada uma de tiolase, de-hidrogenase de 3-hidroxi-butiril-CoA, Crotonase, de-hidrogenase de butiril-CoA, Flavoproteína de Transferência de Elétrons A e Flavoproteína de Transferência de Elétrons B

5                   Em uma modalidade, o micro-organismo compreende um ou mais ácidos nucleicos exógenos que codificam cada uma das enzimas tiolase, de-hidrogenase de 3-hidroxi-butiril-CoA, crotonase/hidratase de crotonil-CoA e de-hidrogenase de butiril-CoA.

10                   De preferência, o micro-organismo compreende ainda um promotor de quinase de acetato/fosfo-transacetilase exógeno. De preferência, o promotor corresponde à SEQ ID NO. 7 ou uma variante funcionalmente equivalente da mesma.

De preferência, o promotor está contido em um construto que codifica uma ou mais das enzimas aqui antes mencionadas.

15                   Em uma modalidade, o micro-organismo compreende ácidos nucleicos exógenos adaptados para expressar uma ou mais das enzimas escolhidas do grupo que consiste em:

Fosfo-transbutirilase;

quinase de butirato;

20                   óxido-redutase de aldeído dependente de ferredoxina;

de-hidrogenase de butiraldeído;

de-hidrogenase de butanol;

uma de-hidrogenase de butiraldeído e de-hidrogenase de butanol bifuncional.

25                   Em uma modalidade, o micro-organismo compreende ácidos nucleicos exógenos adaptados para expressar uma ou mais de de-hidrogenase de butiraldeído, de-hidrogenase de butanol e uma de-hidrogenase de butiraldeído /de-hidrogenase de butanol bifuncional. De preferência, o micro-organismo compreende um ou mais ácidos nucleicos exógenos que codificam  
30                   uma ou mais de de-hidrogenase de butiraldeído, de-hidrogenase de butanol e uma de-hidrogenase de butiraldeído /de-hidrogenase de butanol bifuncional.

Em uma modalidade, o micro-organismo compreende ácidos nucleicos exógenos adaptados para expressar uma ou mais de fosfotransbutirilase, quinase de butirato, óxido-redutase de aldeído dependente de ferredoxina e de-hidrogenase de butanol. De preferência, o micro-organismo compreende um ou mais ácidos nucleicos exógenos que codificam uma ou mais de fosfotransbutirilase, quinase de butirato, óxido-redutase de aldeído dependente de ferredoxina e de-hidrogenase de butanol. Em modalidades particulares, o micro-organismo compreende ácidos nucleicos exógenos adaptados para expressar cada uma de fosfotransbutirilase, quinase de butirato, óxido-redutase de aldeído dependente de ferredoxina e de-hidrogenase de butanol.

Em uma modalidade, o um ou mais ácidos nucleicos que codificam uma ou mais enzimas são escolhidos dos ácidos nucleicos descritos nas Tabelas 7 a 10 aqui depois e variantes funcionalmente equivalentes das mesmas.

Em uma modalidade, o micro-organismo compreende um ou mais ácidos nucleicos adequados para expressar pelo menos duas das enzimas na via de biossíntese de butanol, pelo menos 3, pelo menos 4, pelo menos 5, pelo menos 6, pelo menos 7, pelo menos 8, pelo menos 9, pelo menos 10, pelo menos 11 ou pelo menos 12 das enzimas.

Em uma modalidade, o micro-organismo compreende um ou mais ácidos nucleicos adequados para expressar tiolase, de-hidrogenase de 3-hidroxi-butiril-CoA, Crotonase/hidratase de crotonil-CoA, de-hidrogenase de butiril-CoA, Flavoproteína A de Transferência de Elétrons, Flavoproteína B de Transferência de Elétrons e uma ou ambas de desidrogenase de butiraldeído e de-hidrogenase de butanol (ou uma enzima bifuncional).

Em uma modalidade, o micro-organismo compreende um ou mais ácidos nucleicos adequados para expressar tiolase, de-hidrogenase de 3-hidroxi-butiril-CoA, Crotonase/hidratase de crotonil-CoA, de-hidrogenase de butiril-CoA, Flavoproteína A de Transferência de Elétrons, Flavoproteína B de Transferência de Elétrons e pelo menos uma de fosfotransbutirilase e quinase de butirato e óxido-redutase de aldeído dependente de ferredoxina e

desidrogenase de butanol.

De preferência, o micro-organismo é selecionado do grupo de bactérias acetogênicas carboxitróficas. Em determinadas modalidades, o micro-organismo é selecionado do grupo que compreende *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium ragsdalei*, *Clostridium carboxidivorans*, *Clostridium drakei*, *Clostridium scatologenes*, *Butyribacterium limosum*, *Butyribacterium methylotrophicum*, *Acetobacterium woodii*, *Alkalibaculum bacchii*, *Blautia producta*, *Eubacterium limosum*, *Moorella thermoacetica*, *Moorella thermautotrophica*, *Oxobacter pfennigii* e *Thermoanaerobacter kiuvi*.

De preferência, o micro-organismo é *Clostridium autoethanogenum* DSM23693.

Em uma modalidade, o micro-organismo recombinante da invenção tem as características que definem o micro-organismo depositado na DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Alemanha) sob o número de acesso DSM24138.

Em um segundo aspecto, a invenção proporciona um gene recombinante de metiltransferase de acordo com Nucleotídeo SEQ ID NO. 27 ou uma variante funcionalmente equivalente à mesma.

Em um terceiro aspecto, a invenção proporciona uma metiltransferase de acordo com SEQ ID NO. 28 ou uma variante de aminoácidos funcionalmente equivalentes das mesmas.

Em um aspecto relacionado, a invenção proporciona um micro-organismo recombinante que compreende um gene de metiltransferase de acordo com o segundo aspecto. O gene de metiltransferase pode estar presente em um construto de ácido nucleico ou integrado no genoma do micro-organismo.

Em um quarto aspecto, a invenção proporciona um ácido nucleico compreendendo SEQ ID NO. 1 a 6 ou variantes funcionalmente equivalentes das mesmas, em qualquer ordem.

De preferência, o ácido nucleico compreende SEQ ID NO. 1 a 6, na ordem mostrada na Figura 2.



De preferência, o ácido nucleico compreende ainda um promotor de butiril/acetil transferase de fosfato. De preferência, o promotor corresponde à SEQ ID NO. 7 ou uma variante funcionalmente equivalente à mesma.

5 Em um quinto aspecto, a invenção proporciona um construto de expressão que compreende uma ou mais sequências de ácido nucleico em que o construto, quando expresso em um micro-organismo acetogênico, resulta em 1-butanol e/ou um precursor do mesmo sendo produzido como o principal produto de fermentação.

10 De preferência, a uma ou mais sequências de ácidos nucleicos codificam uma ou mais enzimas que são parte da via de biossíntese de 1-butanol.

De preferência, os ácidos nucleicos são selecionados de ácidos nucleicos que codificam tiolase, de-hidrogenase de 3-hidroxi-butilil-CoA, crotonase, de-hidrogenase de butiril-CoA, Flavoproteína A de transferência de elétrons e/ou Flavoproteína B de transferência de elétrons.

15 De preferência, a uma ou mais sequências de ácido nucleico são selecionadas de SEQ ID NO. 1 a SEQ ID NO. 6 ou variantes funcionalmente equivalentes das mesmas.

20 Em uma modalidade, os ácidos nucleicos são ainda selecionados de ácidos nucleicos que codificam Fosfotransbutirilase, quinase de butirato, óxido-redutase de aldeído dependente de ferredoxina, de-hidrogenase de butiraldeído, de-hidrogenase de butanol e uma de-hidrogenase de butiraldeído/de-hidrogenase de butanol bifuncional.

25 Em uma modalidade, os ácidos nucleicos são selecionados do grupo de ácidos nucleicos descritos nas Tabelas 7 a 10 aqui depois e variantes funcionalmente equivalentes das mesmas.

30 Em uma modalidade, o construto de expressão codifica pelo menos duas enzimas na via de biossíntese de butanol, pelo menos 3, pelo menos 4, pelo menos 5, pelo menos 6, pelo menos 7, pelo menos 8, pelo menos 9, pelo menos 10, pelo menos 11 ou pelo menos 12 das enzimas.

De preferência, o construto de expressão compreende ainda um promotor do óperon de butiril/acetil transferase de fosfato. Em outra modali-

dade, o construto de expressão compreende outro promotor altamente ativo, tal como o promotor óxido-redutase de ferredoxina:piruvato (SEQ ID NO. 48), o agrupamento gênico de Wood-Ljungdahl (SEQ ID NO. 47), óperon de Rnf (SEQ ID NO. 49) ou o óperon de sintase de ATP (SEQ ID NO. 50). De preferência, o promotor do óperon de butiril/acetil transferase de fosfato corresponde à SEQ ID NO. 7 ou uma variante funcionalmente equivalente à mesma.

Em um sexto aspecto, a invenção proporciona um construto que compreende um gene de metiltransferase, conforme descrito aqui.

10 Em um sétimo aspecto, a invenção proporciona uma composição compreendendo o construto de expressão do quinto aspecto e o construto de metilação do sexto aspecto.

De preferência, a composição é capaz de produzir um micro-organismo recombinante que produz 1-butanol e/ou um precursor do mesmo como o principal produto de fermentação.

15 Em um oitavo aspecto, a invenção proporciona um método de produção de um micro-organismo recombinante compreendendo:

a. introdução, em um micro-organismo de transporte, de (i) um construto de expressão e (ii) um construto de metilação de acordo com o sexto aspecto que compreende um gene de metiltransferase;

b. expressão do gene de metiltransferase;

c. isolamento de um ou mais construtos do micro-organismo de transporte; e

d. introdução de pelo menos um construto de expressão em um micro-organismo de destino;

25 em que o construto de expressão compreende um ou mais genes que codificam enzimas a serem expressas no micro-organismo de destino.

Em uma modalidade, expressão do gene de metiltransferase na etapa b. é constitutiva. Em outra modalidade, expressão do gene de metiltransferase na etapa b. é induzida.

Em uma modalidade, o construto de metilação e o construto de

expressão são ambos isolados na etapa c. Em outra modalidade, o construto de expressão é isolado na etapa c.

Em uma modalidade, apenas o construto de expressão é introduzido no micro-organismo de destino. Em outra modalidade, o construto de expressão e o construto de metilação são ambos introduzidos no micro-organismo de destino.

De preferência, o construto de expressão é conforme definido no quinto aspecto.

De preferência, o micro-organismo recombinante produz 1-butanol e/ou um precursor do mesmo como o principal produto de fermentação.

Em um aspecto relacionado, a invenção proporciona um método de produção de um micro-organismo recombinante compreendendo:

a. metilação de um construto de expressão *in vitro* por uma metiltransferase de acordo com SEQ ID NO. 28 ou uma variante funcionalmente equivalente à mesma;

b. introdução de um construto de expressão em um micro-organismo de destino;

em que o construto de expressão compreende um ou mais genes que codificam enzimas a serem expressas no micro-organismo de destino.

De preferência, o construto de expressão é conforme definido no quinto aspecto.

De preferência, o micro-organismo recombinante produz 1-butanol e/ou um precursor do mesmo como o principal produto de fermentação.

De preferência, a metiltransferase é produzida por meio de expressão de um gene de metiltransferase, de preferência de acordo com SEQ ID NO. 27 ou uma variante funcionalmente equivalente à mesma, em um micro-organismo e isolamento da enzima metiltransferase.

Em um outro aspecto relacionado, a invenção proporciona um método de produção de um micro-organismo recombinante compreendendo:

a. introdução, no genoma de um micro-organismo de transporte, de um gene de metiltransferase, de preferência de acordo com SEQ ID NO. 27 ou uma variante funcionalmente equivalente à mesma;

5 b. introdução de um construto de expressão no micro-organismo de transporte;

c. isolamento de um ou mais construtos do micro-organismo de transporte; e

d. introdução de pelo menos um construto de expressão em um micro-organismo de destino;

10 em que o construto de expressão compreende um ou mais genes que codificam enzimas a serem expressas no micro-organismo de destino.

De preferência, o construto de expressão é conforme definido no quinto aspecto.

15 De preferência, o micro-organismo recombinante produz 1-butanol e/ou um precursor do mesmo como o principal produto de fermentação.

Em um outro aspecto relacionado, a invenção proporciona um método de produção de um micro-organismo recombinante compreendendo:

20 a. metilação de um construto de expressão de acordo com o quinto aspecto *in vitro* por uma metiltransferase;

b. introdução do construto de expressão em um micro-organismo de destino.

25 De preferência, a metiltransferase é codificada por um gene de metiltransferase conforme definido no segundo aspecto ou uma metiltransferase conforme definido no terceiro aspecto.

De preferência, o micro-organismo recombinante produz 1-butanol e/ou um precursor do mesmo como o principal produto de fermentação.

30 Em um nono aspecto, a invenção proporciona um método de produção de um micro-organismo recombinante compreendendo:

a. introdução de (i) um construto de expressão de acordo com o

quinto aspecto e (ii) um construto de metilação compreendendo um gene de metiltransferase em um micro-organismo de transporte;

b. expressão do gene de metiltransferase;

c. isolamento de um ou mais construtos do micro-organismo de  
5 transporte; e

d. introdução de pelo menos um construto de expressão em um micro-organismo de destino;

em que o construto de expressão compreende um ou mais genes que codificam enzimas a serem expressas no micro-organismo de destino.  
10 no.

Em uma modalidade, expressão do gene de metiltransferase na etapa b. é constitutiva. Em outra modalidade, expressão do gene de metiltransferase na etapa b. é induzida.

Em uma modalidade, o construto de metilação e o construto de expressão são ambos isolados na etapa c. Em outra modalidade, o construto de expressão é isolado na etapa c.  
15

Em uma modalidade, apenas o construto de expressão é introduzido no micro-organismo de destino. Em outra modalidade, o construto de expressão e o construto de metilação são ambos introduzidos no micro-organismo de destino.  
20

De preferência, o micro-organismo recombinante produz 1-butanol e/ou um precursor do mesmo como o principal produto de fermentação.

Em um décimo aspecto, a invenção proporciona um método de produção de um micro-organismo recombinante que produz 1-butanol ou um precursor do mesmo como o principal produto de fermentação que compreende:  
25

a. introdução de (i) um construto de expressão e (ii) um construto de metilação que compreende um gene de metiltransferase em um micro-organismo de transporte;  
30

b. expressão do gene de metiltransferase;

c. isolamento de um ou mais construtos do micro-organismo de

transporte; e

d. introdução de pelo menos um construto de expressão em um micro-organismo de destino;

em que o construto de expressão compreende um ou mais genes que codificam enzimas a serem expressas no micro-organismo de destino.

Em uma modalidade, expressão do gene de metiltransferase na etapa b. é constitutiva. Em outra modalidade, expressão do gene de metiltransferase na etapa b. é induzida.

Em uma modalidade, o construto de metilação e o construto de expressão são ambos isolados na etapa c. Em outra modalidade, o construto de expressão é isolado na etapa c.

Em uma modalidade, apenas o construto de expressão é introduzido no micro-organismo de destino. Em outra modalidade, o construto de expressão e o construto de metilação são ambos introduzidos no micro-organismo de destino.

De preferência, o construto de expressão é conforme definido no quinto aspecto.

De preferência, o construto de metilação é conforme definido no sexto aspecto.

Em um décimo primeiro aspecto, a invenção proporciona um método de produção de 1-butanol e/ou um precursor do mesmo por meio de fermentação microbiana que compreende fermentação de um substrato usando um micro-organismo recombinante.

De preferência, 1-butanol e/ou um precursor do mesmo é o principal produto de fermentação.

De preferência, o micro-organismo recombinante é conforme descrito em qualquer um dos oitavo a décimo aspectos.

De preferência, 1-butanol e/ou um precursor do mesmo é produzido em um rendimento de aproximadamente de 0,075 gramas por litro de caldo de fermentação ( g/l) a cerca de 20 g/l. Em uma modalidade, o rendimento é aproximadamente 0,15 g/l a aproximadamente 1,54 g/l. Em outras

modalidades, o rendimento é aproximadamente 10 g/l, aproximadamente 5 g/l ou aproximadamente 2 g/l. De preferência, o rendimento de 1-butanol é até o limite em que o butanol se torna tóxico para o meio circundante.

De preferência, o substrato compreende CO. De preferência, o substrato é um substrato gasoso que compreende CO. Em uma modalidade, o substrato compreende um gás residual industrial. Em determinadas modalidades, o gás é gás residual ou syngas de usinagem de aço.

Em uma modalidade, o substrato conterà, tipicamente, uma grande proporção de CO, tal como pelo menos cerca de 20% a cerca de 100% de CO em volume, de 20% a 70% de CO em volume, de 30% a 60% de CO em volume e de 40% a 55% de CO em volume. Em modalidades particulares, o substrato compreende cerca de 25% ou cerca de 30% ou cerca de 35% ou cerca de 40% ou cerca de 45% ou cerca de 50% de CO ou cerca de 55% de CO ou cerca de 60% de CO em volume.

Embora não seja necessário que o substrato contenha qualquer hidrogênio, a presença de H<sub>2</sub> não deverá ser prejudicial para a formação de produto de acordo com os métodos da invenção. Em modalidades particulares, a presença de hidrogênio resulta em uma eficiência global aumentada da produção de álcool. Por exemplo, em modalidades particulares, o substrato pode compreender uma proporção aproximada de H<sub>2</sub>:CO de 2:1 ou 1:1 ou 1:2. Em uma modalidade, o substrato compreende cerca de 30% ou menos de H<sub>2</sub> em volume, 20% ou menos de H<sub>2</sub> em volume, cerca de 15% ou menos de H<sub>2</sub> em volume ou cerca de 10% ou menos de H<sub>2</sub> em volume. Em outras modalidades, a corrente de substrato compreende baixas concentrações de H<sub>2</sub>, por exemplo, menos de 5% ou menos de 4% ou menos de 3% ou menos de 2% ou menos de 1% ou é substancialmente livre de hidrogênio. O substrato também pode conter algum CO<sub>2</sub>, por exemplo, tal como cerca de 1% a cerca de 80% de CO<sub>2</sub> em volume ou 1% a cerca de 30% de CO<sub>2</sub> em volume.

De preferência, o precursor produzido por meio do método de qualquer um dos aspectos anteriores é convertido em 1-butanol na presença de fosfotransbutirilase, quinase de butirato, óxido-redutase de aldeído de-

pendente de ferredoxina e de-hidrogenase de butanol.

De preferência, o micro-organismo produz fosfotransbutirilase, quinase de butirato, óxido-redutase de aldeído dependente de ferredoxina e de-hidrogenase de butanol, tanto antes quanto após introdução de um ácido nucleico exógeno.

De preferência, o precursor produzido por meio do método de qualquer um dos aspectos anteriores é convertido em 1-butanol na presença de de-hidrogenase de butiraldeído, de-hidrogenase de butanol e/ou uma de-hidrogenase de butiraldeído/de-hidrogenase de butanol bifuncional.

De preferência, o micro-organismo produz de-hidrogenase de butiraldeído, de-hidrogenase de butanol e/ou uma de-hidrogenase de butiraldeído/de-hidrogenase de butanol bifuncional antes e após introdução de um ácido nucleico exógeno.

Em um décimo segundo aspecto, a invenção proporciona 1-butanol ou um precursor do mesmo produzido por meio do método do décimo primeiro aspecto.

Em um décimo terceiro aspecto, a invenção proporciona um micro-organismo de transporte que compreende um construto de metilação, conforme definido aqui.

De preferência, o micro-organismo de transporte compreende ainda um construto de expressão conforme definido aqui.

De preferência, o micro-organismo transporte é *E. coli*, *Bacillus subtilis* ou *Lactococcus lactis*.

De preferência, o construto de metilação de qualquer um dos aspectos anteriores compreende um promotor *lac* e o gene de metiltransferase e é induzido por isopropil- $\beta$ -tio-D-galactosídeo (IPTG). Expressão de metiltransferase pode também ser controlada por outros sistemas promotores induzíveis, tais como *ara*, *tet* ou T7.

Em um décimo quarto aspecto, a invenção proporciona um ácido nucleico tendo uma sequência escolhida do grupo que consiste em SEQ ID NOs. 8 a 13.

Em um décimo quinto aspecto, a invenção proporciona um ácido



nucleico tendo uma sequência escolhida do grupo que consiste em SEQ ID NOs. 16 a 23.

Em um décimo sexto aspecto, a invenção proporciona um ácido nucleico compreendendo pelo menos a sequência de ácido nucleico de SEQ ID NO. 7 ou uma variante funcionalmente equivalente à mesma, um construto de ácido nucleico ou vetor compreendendo a mesma e micro-organismos que compreendem o referido ácido nucleico ou construto de ácido nucleico ou vetor.

Em um décimo sétimo aspecto, a invenção proporciona um ácido nucleico o qual codifica uma metiltransferase de acordo com SEQ ID NO. 28.

Em um décimo oitavo aspecto, a invenção proporciona um ácido nucleico compreendendo um ácido nucleico que codifica um polipeptídeo tendo a sequência de aminoácidos de um polipeptídeo escolhido dos grupos listados nas Tabelas 7 a 10 aqui depois e variantes funcionalmente equivalentes de qualquer uma ou mais das mesmas.

Em um décimo nono aspecto, a invenção proporciona um ácido nucleico compreendendo um ácido nucleico escolhido dos grupos listados nas Tabelas 7 a 10 aqui depois e variantes funcionalmente equivalentes de qualquer uma ou mais das mesmas.

Em um vigésimo aspecto, a invenção proporciona construtos e micro-organismos compreendendo um ácido nucleico dos décimo oitavo ou décimo nono aspectos da invenção.

Em um vigésimo primeiro aspecto, a invenção proporciona um ácido nucleico tendo uma sequência escolhida do grupo que consiste em SEQ ID NOs. 32 a 38 e 123 a 135.

Em um vigésimo segundo aspecto, a invenção proporciona um polipeptídeo compreendendo a sequência de aminoácidos de um polipeptídeo escolhido dos grupos listados nas Tabelas 7 a 10 aqui depois e variantes funcionalmente equivalentes de qualquer uma ou mais das mesmas.

A invenção pode também ser referido amplamente como consistindo nas partes, elementos e características referidos ou indicados no rela-

tório descritivo do pedido, individual ou coletivamente, em qualquer ou todas as combinações de duas ou mais das referidas partes, elementos ou características e, onde números inteiros específicos são mencionados aqui, os quais têm equivalentes conhecidos na técnica à qual a invenção se refere, tais equivalentes conhecidos são considerados como sendo incorporados aqui como se individualmente apresentados.

#### BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Estes e outros aspectos da presente invenção, os quais deverão ser considerados em todos os seus novos aspectos, serão evidentes a partir da descrição a seguir, a qual é fornecida a título de exemplo apenas, com referência às Figuras anexas, nas quais:

A Figura 1 mostra a via de biossíntese de butanol a partir de CO.

A Figura 2 mostra um plasmídeo de expressão de genes de codificação exemplificativos envolvidos na biossíntese de 1-butanol.

A Figura 3 mostra os resultados de sequenciamento de pM-TL85245-thIA-crt-hbd, os quais demonstram que os genes de biossíntese de 1-butanol encontrados no plasmídeo de expressão estavam livres de mutações.

As Figuras 4a, 4b e 4c mostram um alinhamento de nucleotídeos de *C. autoethanogenum* (CAU), *C. ljungdahlii* (CLJ), *C. ragsdalei* (CRA) e os genes de metiltransferase concebidas (DMT).

A Figura 4d mostra um alinhamento de aminoácidos das metiltransferases de *C. autoethanogenum* (CAU1+2), *C. ljungdahlii* (CLJ), *C. ragsdalei* (CRA1+2) e a metiltransferase concebida (DMT).

A Figura 5 mostra um plasmídeo de metilação exemplificativo da invenção.

A Figura 6 mostra uma imagem de eletroforese em gel de agarose do DNA de plasmídeo isolado. Fileiras 1, 6, 11, 16, 21 e 26 mostram Ladder de Plus DNA de 100 bp. Fileira 2-5 mostram PCR com mistura de plasmídeo metilado original como modelo na seguinte ordem: *ermB*, *ColE1*, *thIA*, *crt*. Fileiras 7-10, 12-15, 17-20, 22-25 e 27-30 mostram PCR com plasmídeos isolados de 4 clones diferentes como modelo, cada um na seguinte

ordem: *ermB*, *ColE1*, *thIA*, *prt*. Fileiras 32-35 mostram plasmídeo prep de 4 clones diferentes. Fileira 36 mostra plasmídeo prep de *C. autoethanogenum* DSM23693 original.

5 A Figura 7 mostra os resultados de HPLC mostrando a produção de 1-butanol com *C. autoethanogenum* abrigando o plasmídeo de butanol pMTL85245-*thIA*-CRT-hbd.

A Figura 8 mostra uma análise de expressão de mais de 200 genes durante uma fermentação típica com *Clostridium autoethanogenum* em condições convencionais usando PCR em tempo real para identificar 10 regiões promotoras adequadas para a expressão de genes heterólogos.

A Figura 9 mostra a sequência de SEQ ID NOs. 1, 2 e 3.

A Figura 10 mostra a sequência de SEQ ID NOs. 4, 5 e 6.

A Figura 11 mostra a sequência de regiões promotoras codificadas por SEQ ID NOs. 7, 47, 48, 49 e 50.

15 A Figura 12 mostra a sequência de SEQ ID NO. 14.

A Figura 13 mostra a sequência de SEQ ID NO. 15.

A Figura 14 mostra a sequência de SEQ ID NOs. 24 e 25.

A Figura 15 mostra a sequência de SEQ ID NO. 26.

A Figura 16 mostra a sequência de SEQ ID NO. 27.

20 A Figura 17 mostra a sequência de SEQ ID NO. 28.

A Figura 18 mostra a sequência de SEQ ID NO. 29.

A Figura 19 mostra o gene de rRNA 16s de *C. autoethanogenum* (Y18178, GI: 7271109)

As Figuras 20 e 21 mostram a sequência de SEQ ID NO. 31.

25 A Figura 22 mostra Seq. ID 39: sequência de nucleotídeos de de-hidrogenase de butanol/butiraldeído bifuncional de *C. autoethanogenum*.

A Figura 23 mostra Seq. ID 40: sequência de nucleotídeos de de-hidrogenase de butanol/butiraldeído bifuncional de *C. autoethanogenum*.

30 A Figura 24 mostra Seq. ID 41: sequência de nucleotídeos de de-hidrogenase de butiraldeído de *C. autoethanogenum* e Seq. ID 42: sequência de aminoácidos de de-hidrogenase de butiraldeído de *C. autoethanogenum*.

A Figura 25 mostra Seq. ID 43: sequência de nucleotídeos de de-hidrogenase de butiraldeído de *C. autoethanogenum* e Seq. ID 44: sequência de aminoácidos de de-hidrogenase de butiraldeído de *C. autoethanogenum*.

5 A Figura 26 mostra Seq. ID 45: sequência de nucleotídeos de de-hidrogenase de butiraldeído de *C. autoethanogenum*.

A Figura 27 mostra Seq. ID 46: sequência de aminoácidos de de-hidrogenase de butiraldeído de *C. autoethanogenum* e Seq. ID 119: sequência de nucleotídeos de de-hidrogenase de butanol de *C. autoethanogenum*.

10 A Figura 28 mostra Seq. ID 120: sequência de aminoácidos de de-hidrogenase de butanol de *C. autoethanogenum* e Seq. ID 121: sequência de nucleotídeos de de-hidrogenase de butanol de *C. autoethanogenum*.

A Figura 29 mostra Seq. ID 122: sequência de aminoácidos de de-hidrogenase de butanol de *C. autoethanogenum* e Seq. ID 51: sequência de nucleotídeos de de-hidrogenase de butanol de *C. autoethanogenum*.

A Figura 30 mostra Seq. ID 52: sequência de aminoácidos de de-hidrogenase de butanol de *C. autoethanogenum* e Seq. ID 53: sequência de nucleotídeos de de-hidrogenase de butanol de *C. autoethanogenum*.

20 A Figura 31 mostra Seq. ID 54: Sequência de aminoácidos de de-hidrogenase de butanol de *C. autoethanogenum* e Seq. ID 55: sequência de nucleotídeos de de-hidrogenase de butanol de *C. autoethanogenum*.

A Figura 32 mostra Seq. ID 56: Sequência de aminoácidos de de-hidrogenase de butanol de *C. autoethanogenum* e Seq. ID 57: sequência de nucleotídeos de de-hidrogenase de butanol de *C. autoethanogenum*.

25 A Figura 33 mostra Seq. ID 58: sequência de aminoácidos de de-hidrogenase de butanol de *C. autoethanogenum* e Seq. ID 59: sequência de nucleotídeos de acetil/butiril transferase de fosfato de *C. autoethanogenum* e Seq. ID 60: sequência de aminoácidos de acetil/butiril transferase de fosfato de *C. autoethanogenum*.

30 A Figura 34 mostra Seq. ID 61: sequência de nucleotídeos de quinase de acetato/butirato de *C. autoethanogenum* e Seq. ID 62: sequência

de aminoácidos de quinase de acetato/butirato de *C. autoethanogenum*.

A Figura 35 mostra Seq. ID 63: sequência de nucleotídeos de óxido-redutase de aldeído:ferredoxina de *C. autoethanogenum* e Seq. ID 64: sequência de aminoácidos de óxido-redutase de aldeído:ferredoxina de *C. autoethanogenum*.

A Figura 36 mostra Seq. ID 65: sequência de nucleotídeos de óxido-redutase de aldeído:ferredoxina de *C. autoethanogenum* e Seq. ID 66: sequência de aminoácidos de óxido-redutase de aldeído:ferredoxina de *C. autoethanogenum*.

A Figura 37 mostra Seq. ID 67: sequência de nucleotídeos de de-hidrogenase de butanol/butiraldeído bifuncional de *C. ljungdahlii*

A Figura 38 mostra Seq. ID 68: sequência de aminoácidos de de-hidrogenase de butanol/butiraldeído bifuncional de *C. ljungdahlii*

A Figura 39 mostra Seq. ID 69: sequência de nucleotídeos de de-hidrogenase de butanol/butiraldeído bifuncional de *C. ljungdahlii*

A Figura 40 mostra Seq. ID 70: sequência de aminoácidos de de-hidrogenase de butanol/butiraldeído bifuncional de *C. ljungdahlii* e Seq. ID 71: sequência de nucleotídeos de de-hidrogenase de butiraldeído de *C. ljungdahlii*.

A Figura 41 mostra Seq. ID 72: sequência de aminoácidos de de-hidrogenase de butiraldeído de *C. ljungdahlii* e Seq. ID 73: sequência de nucleotídeos de de-hidrogenase de butiraldeído de *C. ljungdahlii* e Seq. ID 74: sequência de aminoácidos de de-hidrogenase de butiraldeído de *C. ljungdahlii*.

A Figura 42 mostra Seq. ID 75: sequência de nucleotídeos de de-hidrogenase de butanol de *C. ljungdahlii* e Seq. ID 76: sequência de aminoácidos de de-hidrogenase de butanol de *C. ljungdahlii* e Seq. ID 77: sequência de nucleotídeos de de-hidrogenase de butanol de *C. ljungdahlii*.

A Figura 43 mostra Seq. ID 78: sequência de aminoácidos de de-hidrogenase de butanol de *C. ljungdahlii* e Seq. ID 79: sequência de nucleotídeos de de-hidrogenase de butanol de *C. ljungdahlii* e Seq. ID 80: sequência de aminoácidos de de-hidrogenase de butanol de *C. ljungdahlii*.

A Figura 44 mostra Seq. ID 81: sequência de nucleotídeos de de-hidrogenase de butanol de *C. ljungdahlii* e Seq. ID 82: sequência de aminoácidos de de-hidrogenase de butanol de *C. ljungdahlii* e Seq. ID 83: sequência de nucleotídeos de de-hidrogenase de butanol de *C. ljungdahlii*.

5 A Figura 45 mostra Seq. ID 84: sequência de aminoácidos de de-hidrogenase de butanol de *C. ljungdahlii* e Seq. ID 85: sequência de nucleotídeos de acetil/butiril transferase de fosfato de *C. ljungdahlii* e Seq. ID 86: sequência de aminoácidos de acetil/butiril transferase de fosfato de *C. ljungdahlii* e Seq. ID 87: sequência de nucleotídeos de quinase de acetato/butirato de *C. ljungdahlii*.

10 A Figura 46 mostra Seq. ID 88: sequência de aminoácidos de quinase de acetato/butirato de *C. ljungdahlii* e Seq. ID 89: sequência de nucleotídeos de óxido-redutase de aldeído:ferredoxina de *C. ljungdahlii* e Seq. ID 90: sequência de aminoácidos de óxido-redutase de aldeído:ferredoxina de *C. ljungdahlii*.

15 A Figura 47 mostra Seq. ID 91: sequência de nucleotídeos de óxido-redutase de aldeído:ferredoxina de *C. ljungdahlii* e Seq. ID 92: sequência de aminoácidos de óxido-redutase de aldeído:ferredoxina de *C. ljungdahlii*.

20 A Figura 48 mostra Seq. ID 93: sequência de nucleotídeos de de-hidrogenase de butanol/butiraldeído bifuncional de *C. ragsdalei*

A Figura 49 mostra Seq. ID 94: sequência de aminoácidos de de-hidrogenase de butanol/butiraldeído bifuncional de *C. ragsdalei*

25 A Figura 50 mostra Seq. ID 95: sequência de nucleotídeos de de-hidrogenase de butanol/butiraldeído bifuncional de *C. ragsdalei*.

A Figura 51 mostra Seq. ID 96: sequência de aminoácidos de de-hidrogenase de butanol/butiraldeído bifuncional de *C. ragsdalei* e Seq. ID 97: sequência de nucleotídeos de desidrogenase de butiraldeído de *C. ragsdalei*.

30 A Figura 52 mostra Seq. ID 98: sequência de aminoácidos de desidrogenase de butiraldeído de *C. ragsdalei*; Seq. ID 99: sequência de nucleotídeos de desidrogenase de butiraldeído de *C. ragsdalei* e Seq. ID

100: sequência de aminoácidos de desidrogenase de butiraldeído de *C. ragsdalei*.

A Figura 53 mostra Seq. ID 101: sequência de nucleotídeos de de-hidrogenase de butanol de *C. ragsdalei* e Seq. ID 102: sequência de aminoácidos de de-hidrogenase de butanol de *C. ragsdalei* e Seq. ID 103: sequência de nucleotídeos de de-hidrogenase de butanol de *C. ragsdalei*.

A Figura 54 mostra Seq. ID 104: sequência de aminoácidos de de-hidrogenase de butanol de *C. ragsdalei* e Seq. ID 105: sequência de nucleotídeos de de-hidrogenase de butanol de *C. ragsdalei* e Seq. ID 106: sequência de aminoácidos de de-hidrogenase de butanol de *C. ragsdalei*.

A Figura 55 mostra Seq. ID 107: sequência de nucleotídeos de de-hidrogenase de butanol de *C. ragsdalei* e Seq. ID 108: sequência de aminoácidos de de-hidrogenase de butanol de *C. ragsdalei* e Seq. ID 109: sequência de nucleotídeos de de-hidrogenase de butanol de *C. ragsdalei*.

A Figura 56 mostra Seq. ID 110: sequência de aminoácidos de de-hidrogenase de butanol de *C. ragsdalei* e Seq. ID 111: sequência de nucleotídeos de acetil/butiril transferase de fosfato de *C. ragsdalei* e Seq. ID 112: sequência de aminoácidos de acetil/butiril transferase de fosfato de *C. ragsdalei* e Seq. ID 113: sequência de nucleotídeos de quinase de acetato/butirato de *C. ragsdalei*.

A Figura 57 mostra Seq. ID 114: sequência de aminoácidos de quinase de acetato/butirato de *C. ragsdalei* e Seq. ID 115: sequência de nucleotídeos de óxido-redutase de aldeído:ferredoxina de *C. ragsdalei* e Seq. ID 116: sequência de aminoácidos de óxido-redutase de aldeído:ferredoxina de *C. ragsdalei*.

A Figura 58 mostra Seq. ID 117: sequência de nucleotídeos de óxido-redutase de aldeído:ferredoxina de *C. ragsdalei* e Seq. ID 118: sequência de aminoácidos de óxido-redutase de aldeído:ferredoxina de *C. ragsdalei*.

A Figura 59 mostra SEQ ID 136: o gene de rRNA 16s de *Clostridium ljungdahlii* (CP001666.1, GI: 300433347).

A Figura 60 mostra o padrão de expressão gênica de (A) de-

hidrogenase de butiraldeído/butanol bifuncional (Seq ID 39); (B) de-hidrogenase de butiraldeído (SEQ ID 41); (C) de-hidrogenase de butiraldeído (SEQ ID 45); (D) de-hidrogenase de butanol (SEQ ID 53); (E) de-hidrogenase de butanol (SEQ ID 57); (F) acetil/butiril transferase de fosfato (SEQ ID 57); (G), quinase de acetato/butirato (SEQ ID 59); (H) óxido-redutase de aldeído:ferredoxina (SEQ ID 63); (I) óxido-redutase de aldeído:ferredoxina (SEQ ID 65).

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

O seguinte é uma descrição da presente invenção, incluindo modalidades preferidas da mesma, fornecidas em termos gerais. A invenção é ainda elucidada a partir da descrição fornecida sob o cabeçalho "Exemplos" aqui abaixo, os quais fornecem dados experimentais que apoiam a invenção, exemplos específicos de vários aspectos da invenção e meios de realização da invenção.

Dentre outros, os micro-organismos estreitamente relacionado *C. autoethanogenum*, *C. ljungdahlii* e *C. ragsdalei* são conhecidos por serem úteis para a produção de etanol como biocombustível a partir de monóxido de carbono. A fim de produzir 1-butanol como um biocombustível a partir de um substrato gasoso, um sistema de transformação universal para estes organismos foi desenvolvido e produção de 1-butanol como o principal produto de fermentação a partir de CO foi demonstrada.

Os inventores descobriram que, quando os genes particulares que codificam proteínas na via de biossíntese de 1-butanol (Figura 1) foram introduzidos em micro-organismos acetogênicos, estes micro-organismos foram capazes de usar um substrato gasoso para produzir 1-butanol ou um precursor do mesmo como o principal produto da fermentação. Embora alguns micro-organismos não modificados sejam conhecidos por produzir 1-butanol, o rendimento de 1-butanol a partir de CO produzido por estes micro-organismos não modificados é muito baixo. Como um resultado, sua utilidade para a produção de biocombustíveis a partir de substratos gasosos é extremamente limitada em virtude de sua baixa eficiência e subsequente falta de viabilidade comercial. *Clostridium autoethanogenum* produz naturalmente



etanol, acetato, 2,3-butanodiol e ácido láctico, mas não é conhecido pela produção de 1-butanol.

Conforme mostrado na Figura 1, a via de Wood-Ljungdahl converte CO em acetil-CoA. Este composto pode ser posteriormente convertido em 1-butanol em micro-organismos acetogênicos pela ação das enzimas tiolase, de-hidrogenase de 3-hidroxi-butil-CoA, crotonase/hidratase de crotonil-CoA, de-hidrogenase de butiril-CoA, de-hidrogenase de butiraldeído e de-hidrogenase de butanol. Em uma modalidade particular da invenção, o micro-organismo expressa as primeiras quatro enzimas, as quais podem ser codificadas pelos ácidos nucleicos SEQ ID NOs. 1 a 4 ou variantes funcionalmente equivalentes das mesmas. A presente invenção fornece um micro-organismo que facilita a conversão de acetil-CoA em 1-butanol pela ação de enzimas codificadas por ácidos nucleicos recombinantes, bem como enzimas que ocorrem naturalmente. A invenção também proporciona o uso de micro-organismos que expressam outras sequências de ácido nucleico recombinantes, as quais codificam enzimas em outros estágios nas vias de biossíntese de butanol ou Wodd-Ljungdahl. Os inventores também identificaram uma série de novas enzimas e ácidos nucleicos.

Uma vez que não há uma competência natural (absorção de DNA extracelular a partir do ambiente da célula) conhecida em Clostridia, eletrotransformação ou conjugação são os únicos métodos disponíveis para transformação. Estas questões representam dificuldades significativas na transformação eficaz de espécies Clostridium. Adicionalmente, os sistemas de restrição/metilação encontrados em Clostridia protegem contra DNA estranho e de fago e resultam em sua transformação genética sendo particularmente problemática. Foi mostrado que transformação de várias cepas de Clostridium (*C. acetobutylicum* ATCC824, *C. cellulolyticum* ATCC35319, *C. botulinum* ATCC25765 e *C. difficile* CD3 e CD6) é possível somente se o DNA é metilado *in vivo* em *E. coli* ou metilado *in vitro* em um padrão específico antes de transformação (Memelstein *et al.*, 1993; Herbert *et al.*, 2003; Jennert *et al.*, 2000; Davis *et al.*, 2000). No entanto, a determinação do padrão correto de metilação muitas vezes não é possível em virtude de exonu-

cleases inespecíficas, etc. Adicionalmente, muitas espécies de Clostridium também possuem sistemas de restrição os quais digerem o DNA que é metilado em uma posição específica ("errado").

Os principais obstáculos mencionados acima foram superados pelos inventores no desenvolvimento dos micro-organismos recombinantes da presente invenção. Um sistema de metilação inovador compreendendo um novo gene de metiltransferase foi desenvolvido para contornar as barreiras de restrição que ocorrem naturalmente presentes em micro-organismos acetogênicos nativos. Conseqüentemente, o método de metilação e gene de metiltransferase da presente invenção podem ser aplicados a uma série de micro-organismos compatíveis que possuem barreiras que impedem a introdução e expressão eficazes de ácidos nucleicos recombinantes desejáveis em micro-organismos.

#### Definições

Conforme referido aqui, "precursores de 1-butanol" incluem butiril-CoA, butiril-fosfato, butirato e butiraldeído.

Conforme referido aqui, um "caldo de fermentação" é um meio de cultura compreendendo pelo menos meios nutrientes e células bacterianas.

Conforme referido aqui, um "micro-organismo de transporte" é um micro-organismo no qual uma enzima metiltransferase é expressa e é distinto do micro-organismo de destino.

Conforme referido aqui, um "micro-organismo de destino" é um micro-organismo no qual os genes incluídos no construto de expressão são expressos e é distinto do micro-organismo de transporte.

Conforme referido aqui, o termo "principal produto de fermentação" se destina a significar o primeiro produto de fermentação o qual é produzido em maior concentração e/ou rendimento.

Os termos "aumento da eficiência", "eficiência aumentada" e similares, quando usados em relação a um processo de fermentação incluem, porém sem limitações, aumento de um ou mais da taxa de crescimento de micro-organismos que catalisam a fermentação, o volume do produto dese-

jado (tais como álcoois) produzido por volume de substrato (tal como açúcar) consumido, a taxa de produção ou o nível de produção do produto desejado e a proporção relativa do produto desejado produzido comparado com outros subprodutos da fermentação.

5 A frase "substrato que compreende monóxido de carbono" e termos similares deverão ser entendidos como incluindo qualquer substrato no qual monóxido de carbono está disponível para uma ou mais cepas de bactérias para crescimento e/ou fermentação, por exemplo.

10 A frase "substrato gasoso que compreende monóxido de carbono" e frases e termos similares incluem qualquer gás o qual contém um nível de monóxido de carbono. Em determinadas modalidades, o substrato contém pelo menos cerca de 20% a cerca de 100% de CO em volume, de 20% a 70% de CO em volume, de 30% a 60% de CO em volume e de 40% a 55% de CO em volume. Em modalidades particulares, o substrato compreende  
15 cerca de 25% ou cerca de 30% ou cerca de 35% ou cerca de 40% ou cerca de 45% ou cerca de 50% de CO ou cerca de 55% de CO ou cerca de 60% de CO em volume.

Embora não seja necessário que o substrato contenha qualquer de hidrogênio, a presença de H<sub>2</sub> não deverá ser prejudicial para a formação  
20 do produto de acordo com os métodos da invenção. Em modalidades particulares, a presença de hidrogênio resulta em uma eficiência global aumentada de produção de álcool. Por exemplo, em modalidades particulares, o substrato pode compreender uma proporção aproximada de H<sub>2</sub>:CO de 2:1 ou 1:1 ou 1:2. Em uma modalidade, o substrato compreende cerca de 30%  
25 ou menos de H<sub>2</sub> em volume, 20% ou menos de H<sub>2</sub> em volume, cerca de 15% ou menos de H<sub>2</sub> em volume ou cerca de 10% ou menos de H<sub>2</sub> em volume. Em outras modalidades, a corrente de substrato compreende baixas concentrações de H<sub>2</sub>, por exemplo, menos de 5% ou menos de 4% ou menos de 3% ou menos de 2% ou menos de 1% ou é substancialmente livre de hidro-  
30 gênio. O substrato também pode conter algum CO<sub>2</sub>, por exemplo, tal como cerca de 1% a cerca de 80% de CO<sub>2</sub> em volume ou 1% a cerca de 30% de CO<sub>2</sub> em volume. Em uma modalidade, o substrato compreende menos de ou

igual a cerca de 20% de CO<sub>2</sub> em volume. Em modalidades particulares, o substrato compreende menos de ou igual a cerca de 15% de CO<sub>2</sub> em volume, menos de ou igual a cerca de 10% de CO<sub>2</sub> em volume, menos de ou igual a cerca de 5% de CO<sub>2</sub> em volume ou substancialmente nenhum CO<sub>2</sub>.

5 Na descrição a qual segue, modalidades da invenção são descritas em termos de distribuição e fermentação de um "substrato gasoso contendo CO". No entanto, deverá ser notado que o substrato gasoso pode ser fornecido em formas alternativas. Por exemplo, o substrato gasoso contendo CO pode ser fornecido dissolvido em um líquido. Essencialmente, um líquido  
10 é saturado com um gás contendo monóxido de carbono e, então, este líquido é adicionado ao biorreator. Isto pode ser obtido usando uma metodologia padrão. A título de exemplo, um gerador de dispersão de microbolhas (Hensirisak *et al.*, Scale-Up of Microbubble Dispersion Generator For Aerobic Fermentation; Applied Biochemistry and Biotechnology Volume 101, Número  
15 3 / Outubro de 2002) poderia ser usado. A título de exemplo adicional, o substrato gasoso contendo CO pode ser adsorvido sobre um suporte sólido. Tais métodos alternativos são abrangidos pelo uso do termo "substrato contendo CO" e similares.

Em modalidades particulares da invenção, o substrato gasoso  
20 contendo CO é um gás ou efluente residual ou industrial. "Gás ou efluente residual ou industrial" deve ser tomado de forma ampla para incluir qualquer gás compreendendo CO produzido por um processo industrial e incluem gases produzidos como um resultado da fabricação de produtos de metal ferroso, fabricação de produtos não-ferrosos, processos de refino de petróleo,  
25 gaseificação de carvão, gaseificação de biomassa, produção de energia elétrica, produção de negro de fumo e fabricação de coque. Outros exemplos podem ser fornecidos aqui em outra parte.

A menos que o contexto venha a requerer de outra forma, as frases "fermentação", "processo de fermentação" ou "reação de fermentação"  
30 " e similares, conforme usado aqui, se destinam a abranger a fase de crescimento e a fase de biossíntese de produto do processo. Conforme será descrito em maiores detalhes a seguir, em algumas modalidades, o biorrea-

tor pode compreender um primeiro reator de crescimento e um segundo reator de fermentação. Como tal, a adição de metais ou composições a uma reação de fermentação deve ser entendida como incluindo a adição a um ou ambos estes reatores.

5 O termo "biorreator" inclui um dispositivo de fermentação que consiste em um ou mais vasos e/ou torres ou configuração de tubulação, a qual inclui o Reator de Tanque Agitado Contínuo (Continuous Stirred Tank Reactor - CSTR), Reator de Células Imobilizadas (Immobilized Cell Reactor - ICR), Reator de Leito de Gotejamento (Trickle Bed Reator - TBR), Coluna de  
10 Bolhas, Fermentador por Elevação a Gás, Misturador Estático ou outro vaso ou outro dispositivo adequado para contato gás-líquido. Conforme é ainda descrito aqui depois, em algumas modalidades, o biorreator pode compreender um primeiro reator de crescimento e um segundo reator de fermentação. Como tal, quando de referência à adição de substrato ao biorreator ou  
15 reação de fermentação, isto deverá ser entendido como incluindo a adição a um ou ambos destes reatores, onde apropriado.

"Ácidos nucleicos exógenos" são ácidos nucleicos os quais se originam fora do micro-organismo no qual eles são introduzidos. Ácidos nucleicos exógenos podem ser derivados de qualquer fonte apropriada incluindo, porém sem limitações, o micro-organismo no qual eles têm de ser introduzidos, cepas ou espécies de micro-organismos que diferem do organismo no qual elas devem ser introduzidas ou eles podem ser criados artificial ou recombinante. Em uma modalidade, os ácidos nucleicos exógenos representam sequências de ácidos nucleicos presentes naturalmente no micro-  
20 organismo no qual elas têm de ser introduzidas e eles são introduzidos para aumentar a expressão ou superexpressão de um gene em particular (por exemplo, mediante aumento do número de cópias da sequência (por exemplo, um gene)). Em outra modalidade, os ácidos nucleicos exógenos representam sequências de ácido nucleico não naturalmente presentes dentro do  
25 micro-organismo no qual eles devem ser introduzidos e permitem a expressão de um produto não naturalmente presente no micro-organismo ou expressão aumentada de um gene nativo ao micro-organismo (por exemplo, no  
30

caso de introdução de um elemento regulador, tal como um promotor). O ácido nucleico exógeno pode ser adaptado para se integrar no genoma do micro-organismo no qual ele tem de ser introduzido ou permanecer em um estado extra-cromossômico.

5                   Será apreciado que a invenção pode ser praticada usando ácidos nucleicos cuja sequência difere das sequências especificamente exemplificadas aqui, contanto que eles desempenhem substancialmente a mesma função. Para sequências de ácidos nucleicos que codificam uma proteína ou um peptídeo, isto significa que a proteína ou peptídeo codificado tem substancialmente a mesma função. Para sequências de ácidos nucleicos que representam sequências promotoras, a sequência variante terá a capacidade de promover a expressão de um ou mais genes. Tais ácidos nucleicos podem ser referidos aqui como "variantes funcionalmente equivalentes". A título de exemplo, variantes funcionalmente equivalentes de um ácido nucleico incluem variantes alélicas, fragmentos de um gene, genes os quais incluem mutações (deleção, inserção, substituições de nucleotídeos e similares) e/ou polimorfismos e similares. Genes homólogos de outras bactérias capazes de fermentação de ácido butírico ou butanol podem também ser considerados como exemplos de variantes funcionalmente equivalentes das sequências especificamente exemplificadas aqui. Estes incluem os genes homólogos em espécies tais como *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium tetani*, *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium kluyveri*, *Clostridium cellulovorans*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium butyricum* cepa DSM10702, *Clostridium tyrobutyricum* cepa ATCC 25755, *Anaerococcus prevotii* DSM 20548, *Thermoanaerobacter tengcongensis*, *Brachyspira pilosicoli*, *Bacillus megaterium*, *Streptococcus pyogenes* e *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*, cujos detalhes estão disponíveis ao público em sites tais como o Genbank ou NCBI. A frase "variantes funcionalmente equivalentes" também deve ser tomada para incluir ácidos nucleicos cuja sequência varia como um resultado de otimização de códon para um organismo particular. "Variantes funcionalmente equivalentes" de um ácido nucleico aqui terão, de preferência, pelo menos cerca de

70%, de preferência cerca de 80%, mais preferivelmente cerca de 85%, de preferência cerca de 90%, de preferência cerca de 95% ou mais de identidade de sequência de ácido nucleico com o ácido nucleico identificado. Em uma modalidade particular, a variante funcionalmente equivalente do gene de tiolase, conforme definido aqui, pode ser o gene *atoAB* em *E. coli* (NC\_000913.2; *atoA* = GenelD: 946719; *atoB* = GenelD: 946727). Variantes funcionalmente equivalentes do gene *eftAB*, conforme definido aqui, podem ser encontradas em Tsai e Saier (1995).

Será também apreciado que a invenção pode ser praticada usando polipeptídeos cuja sequência difere das sequências de aminoácidos especificamente exemplificadas aqui. Estas variantes podem ser referidas aqui como "variantes funcionalmente equivalentes". Uma variante funcionalmente equivalente de uma proteína ou um peptídeo inclui aquelas proteínas ou peptídeos que compartilham pelo menos 40%, de preferência 50%, de preferência 60%, de preferência 70%, de preferência 75%, de preferência 80%, de preferência 85%, de preferência 90%, de preferência 95% ou mais de identidade de aminoácidos com a proteína ou peptídeo identificado e tem substancialmente a mesma função que o peptídeo ou proteína de interesse. Tais variantes incluem, dentro de seu escopo, fragmentos de uma proteína ou um peptídeo, em que o fragmento compreende uma forma truncada do polipeptídeo, em que deleções podem ser de 1 a 5, a 10, a 15, a 20, a 25 aminoácidos e podem se estender do resíduo 1 a 25 em cada término do polipeptídeo e em que deleções podem ser de qualquer comprimento dentro da região; ou podem estar em uma localização interna. Variantes funcionalmente equivalentes dos polipeptídeos específicos aqui também deve ser tomado para incluir polipeptídeos expressos por genes homólogos em outras espécies de bactérias, por exemplo, conforme exemplificado no parágrafo anterior.

"Substancialmente a mesma função", conforme usado aqui, se destina a significar que o ácido nucleico ou polipeptídeo é capaz de desempenhar a função do ácido nucleico ou polipeptídeo do qual ele é uma variante. Por exemplo, uma variante de uma enzima da invenção será capaz de

catalisar a mesma reação que a enzima. No entanto, isso não deve ser tomado como significando que a variante tem o mesmo nível de atividade que o polipeptídeo ou ácido nucleico do qual ela é uma variante.

5           Pode-se avaliar se uma variante funcionalmente equivalente tem substancialmente a mesma função que o ácido nucleico ou polipeptídeo do qual ela é uma variante usando qualquer número de métodos conhecidos. No entanto, a título de exemplo, os métodos descritos em Inui *et al.* (2008) podem ser usados para avaliar a atividade enzimática.

10           "Superexpressar", "superexpressão" e termos e frases similares, quando usados em relação à invenção, deverão ser tomados de forma ampla para incluir qualquer aumento na expressão de uma ou mais proteínas quando comparado com o nível de expressão da proteína de um micro-organismo parental sob as mesmas condições. Ele não deve ser tomado para significar que a proteína é expressa em qualquer nível particular.

15           Um "micro-organismo parental" é um micro-organismo usado para gerar um micro-organismo recombinante da presente invenção. O micro-organismo parental pode ser um que ocorre na natureza (isto é, um micro-organismo do tipo silvestre) ou um que tenha sido previamente modificado, mas o qual não expressa ou superexpressa uma ou mais das enzimas da  
20           presente invenção. Consequentemente, os micro-organismos recombinantes da presente invenção foram modificados para expressar ou superexpressar uma ou mais enzimas que não eram expressas ou superexpressas no micro-organismo parental.

25           Os termos "construtos de ácido nucleico" ou "vetores" e termos similares deverão ser tomados de forma ampla para incluir qualquer ácido nucleico (incluindo DNA e RNA) apropriado para uso como um veículo para transferir material genético para uma célula. Os termos deverão ser entendidos como incluindo plasmídeos, vírus (incluindo bacteriófagos), cosmídeos e cromossomos artificiais. Construtos ou vetores podem incluir um ou mais  
30           elementos reguladores, uma origem de replicação, um sítio de clonagem múltipla e/ou um marcador selecionável, dentre outros elementos, sítios e marcadores. Em uma modalidade particular, os construtos ou vetores são



adaptados para permitir expressão de um ou mais genes codificados pelo construto ou vetor. Construtos de ácido nucleico ou vetores incluem ácidos nucleicos livres, bem como ácidos nucleicos formulados com um ou mais agentes para facilitar a distribuição a uma célula (por exemplo, ácido nucleico conjugado a lipossoma, um organismo no qual o ácido nucleico está con-

5 tido).

Deverá ser notado que os ácidos nucleicos da invenção podem estar em qualquer forma adequada, incluindo RNA, DNA ou cDNA, incluindo ácidos nucleicos fita dupla e fita simples.

10 Em um aspecto, a invenção proporciona micro-organismos geneticamente modificados capazes de usar CO para produzir 1-butanol e/ou um precursor do mesmo como o principal produto de fermentação. O micro-organismo é, de preferência, um micro-organismo recombinante acetogênico que produz 1-butanol e/ou um precursor do mesmo como o principal produto

15 de fermentação. Em uma modalidade particular, o micro-organismo recombinante acetogênico é capaz de produzir 1-butanol ou um precursor do mesmo por meio de fermentação de um substrato que compreende CO em uma concentração maior do que aproximadamente de 1 mM ou 0,075 g/l de butanol por litro de caldo de fermentação.

20 Em uma modalidade particular, o micro-organismo compreende um ou mais ácidos nucleicos exógenos adaptados para expressar ou superexpressar uma ou mais enzimas na via de biossíntese de butanol. Em uma modalidade, o micro-organismo é adaptado para expressar uma ou mais enzimas na via de biossíntese de butanol que não estão naturalmente presentes no micro-organismo parental do qual ele é derivado ou superexpres-

25 sar uma ou mais enzimas na via de biossíntese de butanol que estão naturalmente presentes no micro-organismo parental.

O micro-organismo pode ser adaptado para expressar ou superexpressar uma ou mais enzimas por meio de qualquer número de métodos recombinantes incluindo, por exemplo, aumento de expressão de genes nativos dentro do micro-organismo (por exemplo, mediante introdução de um

30 promotor forte ou constitutivo para disparar a expressão de um gene), au-

mento do número de cópias de um gene que codifica uma enzima em particular mediante introdução de ácidos nucleicos exógenos que codificam e adaptados para expressar a enzima, introdução de um ácido nucleico exógeno que codifica e adaptado para não expressar uma enzima naturalmente presente no micro-organismo parental.

Em determinadas modalidades, o micro-organismo parental pode ser transformado para proporcionar uma combinação de expressão aumentada ou superexpressão de um ou mais genes nativos ao micro-organismo parental e introdução de um ou mais genes que não são nativos ao micro-organismo parental.

De preferência, o micro-organismo compreende um ou mais ácidos nucleicos exógenos que codificam uma ou mais das enzimas escolhidas do grupo que consiste em: tiolase, de-hidrogenase de 3-hidroxi-butiril-CoA; Crotonase/hidratase de crotonil-CoA; de-hidrogenase de butiril-CoA; Flavoproteína A de Transferência de Elétrons; e Flavoproteína B de Transferência de Elétrons. Em uma modalidade, o um ou mais ácidos nucleicos que codificam uma ou mais enzimas são escolhidos dentre ácidos nucleicos de SEQ ID NO. 1 a SEQ ID NO. 6 ou variantes funcionalmente equivalentes das mesmas.

Em uma modalidade, o micro-organismo recombinante é adaptado para expressar um ou mais dos genes os quais codificam as enzimas tiolase (nomenclatura de enzima no IUBMB EC: 2.3.1.9) (*thlA*), de-hidrogenase de 3-hidroxi-butiril-CoA (EC: 1.1.1.157) (*hbd*), crotonase/hidratase de crotonil-CoA (EC: 1.1.1.157) (*crt* ou *cch*) e/ou de-hidrogenase de butiril-CoA (EC4.2.1.55) (*bcd*). Em uma modalidade, o micro-organismo é adaptado para expressar todas estas enzimas. Em outra modalidade, os genes que correspondem a uma ou mais das sequências de ácido nucleico selecionadas de SEQ ID NOs. 1 a 4 ou variantes funcionalmente equivalentes das mesmas. O micro-organismo recombinante da invenção também pode conter duas proteínas de transferência de elétrons. Em uma modalidade, as proteínas de transferência de elétrons são flavoproteínas de transferência de elétrons (EC1.3.99.2) (*effAB*) codificadas por SEQ ID NOs.

5 e 6 ou variantes funcionalmente equivalentes das mesmas. O uso destas flavoproteínas de transferência de elétrons aumenta a eficiência do micro-organismo em produzir 1-butanol. As flavoproteínas proporcionam um complexo estável que é necessário para atividade de Bcd.

5 Em uma modalidade particular, o micro-organismo compreende um ou mais ácidos nucleicos exógenos que codificam cada uma de tiolase, de-hidrogenase de 3-hidroxi-butiril-CoA, Crotonase, de-hidrogenase de butiril-CoA, Flavoproteína de Transferência de Elétrons A e Flavoproteína de Transferência de Elétrons B.

10 Em uma modalidade, o micro-organismo compreende um plasmídeo que codifica uma ou mais ou, de preferência, cada uma de tiolase, de-hidrogenase de 3-hidroxi-butiril-CoA, Crotonase, de-hidrogenase de butiril-CoA, Flavoproteína de Transferência de Elétrons A e Flavoproteína de Transferência de Elétrons B.

15 Em uma modalidade ou alternativamente, o micro-organismo compreende ainda ácidos nucleicos exógenos adaptados para expressar uma ou mais das enzimas escolhidas do grupo que consiste em: fosfotransbutirilase; quinase de butirato; óxido-redutase de aldeído dependente de ferredoxina (ou, em outras palavras, óxido-redutase de aldeído:ferredoxina);  
20 de-hidrogenase de butiraldeído; de-hidrogenase de butanol; uma de-hidrogenase de butiraldeído/de-hidrogenase de butanol bifuncional.

Em uma modalidade, o micro-organismo compreende ácidos nucleicos exógenos adaptados para expressar uma ou mais de de-hidrogenase de butiraldeído, de-hidrogenase de butanol e uma de-hidrogenase de butiraldeído /de-hidrogenase de butanol bifuncional. De preferência, o micro-organismo compreende um ou mais ácidos nucleicos exógenos que codificam uma ou mais de de-hidrogenase de butiraldeído, de-hidrogenase de butanol e uma de-hidrogenase de butiraldeído /de-hidrogenase de butanol bifuncional.

30 Em uma modalidade, o micro-organismo compreende ácidos nucleicos exógenos adaptados para expressar uma ou mais de fosfotransbutirilase, quinase de butirato, óxido-redutase de aldeído dependente de ferredo-

xina e de-hidrogenase de butanol. De preferência, o micro-organismo compreende um ou mais ácidos nucleicos exógenos que codificam uma ou mais de fosfotransbutirilase, quinase de butirato, óxido-redutase de aldeído dependente de ferredoxina e de-hidrogenase de butanol. Em modalidades particulares, o micro-organismo compreende ácidos nucleicos exógenos adaptados para expressar cada uma de fosfotransbutirilase, quinase de butirato, óxido-redutase de aldeído dependente de ferredoxina e de-hidrogenase de butanol.

Em uma modalidade, o micro-organismo compreende um ou mais ácidos nucleicos adequados para expressar pelo menos duas das enzimas na via de biossíntese de 1-butanol, pelo menos 3, pelo menos 4, pelo menos 5, pelo menos 6, pelo menos 7, pelo menos 8, pelo menos 9, pelo menos 10, pelo menos 11 ou pelo menos 12 das enzimas.

Em uma modalidade, o micro-organismo compreende ainda um promotor de quinase de acetato/fosfotransacetilase, embora possam ser usados outros promotores. De preferência, o promotor corresponde à SEQ ID NO. 7 ou uma variante funcionalmente equivalente à mesma. De preferência, o promotor está contido em um construto que codifica uma ou mais das enzimas aqui antes mencionadas.

De preferência, o micro-organismo parental é selecionado do grupo de bactérias acetogênicas carboxitróficas. Em determinadas modalidades, o micro-organismo é selecionado do grupo que compreende *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium ragsdalei*, *Clostridium carboxidivorans*, *Clostridium drakei*, *Clostridium scatologenes*, *Butyribacterium limosum*, *Butyribacterium methylotrophicum*, *Acetobacterium woodii*, *Alkalibaculum bacchii*, *Blautia producta*, *Eubacterium limosum*, *Moorella thermoacetica*, *Moorella thermautotrophica*, *Oxobacter pfennigii* e *Thermoanaerobacter kiuvi*.

Em uma modalidade particular, o micro-organismo parental é selecionado dentre o grupo de Clostridia etanologênicos, acetogênicos compreendendo a espécie *C. autoethanogenum*, *C. ljungdahlii* e *C. ragsdalei* e isolados relacionados. Estes incluem, porém sem limitações, cepas de *C.*

*autoethanogenum* JAI-1<sup>T</sup> (DSM10061) [Abrini J, Naveau H, Nyns E-J: *Clostridium autoethanogenum*, sp. nov., an anaerobic bacterium that produces ethanol from carbon monoxide. Arch Microbiol 1994, 4: 345-351], *C. autoethanogenum* LBS1560 (DSM19630) [Simpson SD, Forster RL, Tran PT, Rowe MJ, Warner IL: Novel bacteria and methods thereof. Patente International 2009, WO/2009/064200], *C. autoethanogenum* LBS1561 (DSM23693), *C. ljungdahlii* PETC<sup>T</sup> (DSM13528 = ATCC 55383) [Tanner RS, Miller LM, Yang D: *Clostridium ljungdahlii* sp. nov., an Acetogenic Species in Clostridial rRNA Homology Group I. Int J Syst Bacteriol 1993, 43: 232-236], *C. ljungdahlii* ERI-2 (ATCC 55380) [Gaddy JL: Clostridium stain which produces acetic acid from waste gases. Patente US 1997, 5.593.886], *C. ljungdahlii* C-01 (ATCC 55988) [Gaddy JL, Clausen EC, Ko C-W: Microbial process for the preparation of acetic acid as well as solvent for its extraction from the fermentation broth. Patente US, 2002, 6.368.819], *C. ljungdahlii* O-52 (ATCC 55989) [Gaddy JL, Clausen EC, Ko C-W: Microbial process for the preparation of acetic acid as well as solvent for its extraction from the fermentation broth. Patente US, 2002, 6.368.819], *C. ragsdalei* P11<sup>T</sup> (ATCC BAA-622) [Huhnke RL, Lewis RS, Tanner RS: Isolation and Characterization of novel Clostridial Species. Patente International 2008, WO 2008/028055], isolados relacionados, tais como "*C. coskatii*" [Zahn JA, Saxena J, Do Y, Patel M, Fishein S, Datta R, Tobey R: *Clostridium coskatii*, sp. nov., an Anaerobic Bacterium that Produces Ethanol from Synthesis Gas. Poster SIM Annual Meeting and Exhibition, San Francisco, 2010] ou cepas com mutação, tais como *C. ljungdahlii* OTA-1 (Tirado-Acevedo O. Production of Bioethanol from Synthesis Gas Using *Clostridium ljungdahlii*. Tese de PhD, North Carolina State University, 2010). Estas cepas formam um subgrupo dentro do agrupamento I de rRNA Clostridial e seu gene de rRNA 16s é mais de 99% idêntico, com um baixo teor similar de GC de cerca de 30%. No entanto, re-associação DNA-DNA e experimentos de caracterização de perfil de DNA mostraram que estas cepas pertencem à espécies distintas [Huhnke RL, Lewis RS, Tanner RS: Isolation and Characterization of novel Clostridial Species. Patente International 2008, WO 2008/028055].

Todas as espécies deste agrupamento têm uma morfologia e tamanho (células em crescimento logarítmico entre 0,5-0,7 x 3-5 µm) similares, são mesofílicas (temperatura de crescimento ótima entre 30-37 °C) e estritamente anaeróbicas [Tanner RS, Miller LM, Yang D: *Clostridium ljungdahlii* sp. nov., an Acetogenic Species in Clostridial rRNA Homology Group I. Int J Syst Bacteriol 1993, 43: 232-236; Abrini J, Naveau H, Nyns E-J: *Clostridium autoethanogenum*, sp. nov., an anaerobic bacterium that produces ethanol from carbon monoxide. Arch Microbiol 1994, 4: 345-351; Huhnke RL, Lewis RS, Tanner RS: Isolation and Characterization of novel Clostridial Species. Patente International 2008, WO 2008/028055]. Além disso, todas elas compartilham os mesmos principais traços filogenéticos, tais como mesma faixa de pH (pH de 4-7,5, com um pH inicial ótimo de 5,5-6), forte crescimento autotrófico sobre gases contendo CO com taxas de crescimento similares e um perfil metabólico similar, com etanol e ácido acético como principais produtos finais de fermentação e pequenas quantidades de ácido 2,3-butanodiol e ácido láctico formadas sob determinadas condições [Tanner RS, Miller LM, Yang D: *Clostridium ljungdahlii* sp. nov., an Acetogenic Species in Clostridial rRNA Homology Group I. Int J Syst Bacteriol 1993, 43: 232-236; Abrini J, Naveau H, Nyns E-J: *Clostridium autoethanogenum*, sp. nov., an anaerobic bacterium that produces ethanol from carbon monoxide. Arch Microbiol 1994, 4: 345-351; Huhnke RL, Lewis RS, Tanner RS: Isolation and Characterization of novel Clostridial Species. Patente International 2008, WO 2008/028055]. Foi observada produção de indola com todas as três espécies. No entanto, as espécies diferenciam quanto à utilização de substrato de vários açúcares (por exemplo, ramnose, arabinose), ácidos (por exemplo, gluconato, citrato), aminoácidos (por exemplo, arginina, histidina) ou outros substratos (por exemplo, betaína, butanol). Além disso, descobriu-se que algumas das espécies são auxotróficas para determinadas vitaminas (por exemplo, tiamina, biotina), enquanto que outras não.

Em uma modalidade, o micro-organismo produz fosfotransbutirilase, quinase de butirato, óxido-redutase de aldeído dependente de ferredoxina e de-hidrogenase de butanol, tanto antes quanto após introdução de um

ácido nucleico exógeno.

Em uma modalidade, o micro-organismo produz de-hidrogenase de butiraldeído e/ou de-hidrogenase de butanol, tanto antes quanto após introdução de um ácido nucleico exógeno.

5 Em uma modalidade particular, o micro-organismo é *Clostridium autoethanogenum* DSM23693.

Em uma modalidade, o micro-organismo recombinante da invenção tem as características que definem o micro-organismo depositado na DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH,  
10 Braunschweig, Alemanha) sob o número de acesso DSM24138.

Os um ou mais ácidos nucleicos exógenos podem ser distribuídos a um micro-organismo parental como ácidos nucleicos livres ou podem ser formulados com um ou mais agentes para facilitar o processo de transformação (por exemplo, ácido nucleico conjugado a lipossoma, um organismo no qual o ácido nucleico está contido). Os um ou mais ácidos nucleicos  
15 podem ser DNA, RNA ou combinações dos mesmos, conforme apropriado.

Os micro-organismos da invenção podem ser preparados a partir de um micro-organismo parental e um ou mais ácidos nucleicos exógenos, usando qualquer número de métodos conhecidos na técnica para a produção de micro-organismos recombinantes. A título apenas de exemplo, transformação (incluindo transdução ou transfecção) pode ser obtida por meio de eletroporação, conjugação ou competência química e natural. Técnicas de transformação adequadas são descritas, por exemplo, em Sambrook *et al.*,  
20 1989.

25 Em determinadas modalidades, em virtude dos sistemas de restrição os quais são ativos no micro-organismo a ser transformado, é necessário metilar o ácido nucleico a ser introduzido no micro-organismo. Isto pode ser feito usando uma variedade de técnicas, incluindo aquelas descritas abaixo e adicionalmente exemplificadas na seção Exemplos aqui depois.

30 Em um outro aspecto, a invenção proporciona um método de produção de um micro-organismo recombinante compreendendo as etapas a seguir:

a. introdução, em um micro-organismo de transporte, de (i) um construto de expressão e (ii) um construto de metilação compreendendo um gene de metiltransferase;

b. expressão do gene de metiltransferase;

5 c. isolamento de um ou mais construtos do micro-organismo de transporte; e

d. introdução de um ou mais construtos em um micro-organismo de destino;

em que o construto de expressão compreende um ou mais genes que codificam enzimas a serem expressas no organismo de destino.

10 Em uma modalidade, o gene de metiltransferase da etapa b é expresso constitutivamente. Em outra modalidade, expressão do gene de metiltransferase da etapa b é induzida.

O micro-organismo é um micro-organismo de transporte, de preferência um micro-organismo restrição-negativo que facilita a metilação das sequências de ácidos nucleicos que compõem o construto de expressão. Em uma modalidade particular, o micro-organismo de transporte é um *E. coli*, *Bacillus subtilis* ou *Lactococcus lactis* restrição-negativo.

20 Uma vez que o construto de expressão e o construto de metilação são introduzidos no micro-organismo de transporte, o gene de metiltransferase presente no construto de metilação é expresso. Em uma modalidade, onde expressão deve ser induzida, indução pode ser através de qualquer sistema promotor adequado embora, em uma modalidade particular da invenção, o construto de metilação compreenda um promotor *lac* induzível

25 (de preferência codificado por SEQ ID NO. 28) e é induzido mediante a adição de lactose ou um análogo do mesmo, mais preferivelmente isopropil- $\beta$ -tio-D-galactosídeo (IPTG). Outros promotores adequados incluem *ara*, *tet* ou o sistema T7. Em uma modalidade alternativa da invenção, o promotor do construto de metilação é um promotor constitutivo.

30 Em uma modalidade, o promotor do construto de expressão é um promotor constitutivo que é, de preferência, altamente ativo sob condições de fermentação adequadas. No entanto, um promotor de indução pode



ser usado. Em modalidades preferidas, o promotor do construto de expressão é selecionado do grupo que compreende promotor do óperon de butiril/acetil transferase de fosfato, óxido-redutase de piruvato:ferredoxina (SEQ ID NO. 48), o agrupamento gênico de Wood-Ljungdahl (SEQ ID NO. 47),  
5 óperon Rnf (SEQ ID NO. 49 ) ou o óperon de sintase ATP ((SEQ ID NO. 50). De preferência, o promotor do óperon de fosfotransacetylase/quinase de acetato corresponde à SEQ ID NO. NO. 7 ou uma variante funcionalmente equivalente da mesma. A Figura 8 mostra que expressão de genes operativamente ligados a estes promotores têm um alto nível de expressão em  
10 *Clostridium autoethanogenum* sob condições padrões.

Em uma modalidade particular, o construto de metilação tem uma origem de replicação específica para a identidade do micro-organismo de transporte, de modo que quaisquer genes presentes no construto de metilação sejam expressos no micro-organismo de transporte. De preferência, o  
15 construto de expressão tem uma origem de replicação específica para a identidade do micro-organismo de destino, de modo que quaisquer genes presentes no construto de expressão sejam expressos no micro-organismo de destino.

Expressão da enzima metiltransferase resulta em metilação dos  
20 genes presentes no construto de expressão. O construto de expressão pode, então, ser isolado do micro-organismo de transporte de acordo com qualquer um de uma série de métodos conhecidos. A título apenas de exemplo, a metodologia descrita na seção Exemplos a seguir pode ser usada para isolar o construto de expressão.

25 Em uma modalidade particular, ambos os construtos são simultaneamente isolados. O construto de expressão pode ser introduzido no micro-organismo de destino usando qualquer série de métodos conhecidos. No entanto, a título de exemplo, a metodologia descrita na seção Exemplos a seguir pode ser usada. Uma vez que o construto de expressão é metilado,  
30 as sequências de ácidos nucleicos presentes no construto de expressão podem ser incorporadas no micro-organismo de destino e expressas com sucesso.

Em outra modalidade, a invenção proporciona um método de produção de um micro-organismo recombinante compreendendo:

5 a. metilação de um construto de expressão *in vitro* por uma metiltransferase, de preferência de acordo com SEQ ID NO. 28 ou uma variante funcionalmente equivalente da mesma; e

b. introdução de um construto de expressão, de preferência de acordo com o quinto aspecto, em um micro-organismo de destino;

10 em que o construto de expressão compreende um ou mais genes que codificam enzimas a serem expressas no micro-organismo de destino.

Considera-se que um gene de metiltransferase da invenção, de preferência de acordo com SEQ ID NO. 27 ou uma variante funcionalmente equivalente da mesma, pode ser introduzido em um micro-organismo de transporte e superexpresso. A enzima metiltransferase resultante pode ser  
15 coletada usando métodos conhecidos e usada *in vitro* para metilar um construto de expressão, de preferência, o construto de expressão é conforme definido no quinto aspecto. O construto de expressão pode, então, ser introduzido no micro-organismo de destino para expressão. De preferência, o micro-organismo recombinante produz 1-butanol e/ou um precursor do  
20 mesmo como o principal produto de fermentação.

Em outra modalidade, a invenção proporciona um método de produção de um micro-organismo recombinante compreendendo:

25 a. introdução, no genoma de um micro-organismo de transporte, de um gene de metiltransferase, de preferência de acordo com SEQ ID NO. 27 ou uma variante funcionalmente equivalente da mesma;

b. introdução de um construto de expressão no micro-organismo de transporte;

c. isolamento de um ou mais construtos do micro-organismo de transporte; e

30 d. introdução de pelo menos um construto de expressão em um micro-organismo de destino;

em que o construto de expressão compreende um ou mais ge-

nes que codificam enzimas a serem expressas no micro-organismo de destino.

São usados métodos padrões para introdução de um gene de metiltransferase, de preferência de acordo com SEQ ID NO. 27, no genoma do micro-organismo de transporte. A metiltransferase pode ser constitutivamente expressa pelo micro-organismo e resultar na produção de uma enzima metiltransferase, de preferência de acordo com SEQ ID NO. 28 ou uma variante funcionalmente equivalente da mesma. Um construto de expressão é metilado, isolado e introduzido no micro-organismo de destino o qual, de preferência, produz 1-butanol e/ou um precursor do mesmo como o principal produto de fermentação.

A invenção também inclui micro-organismos compreendendo um gene de metiltransferase recombinante ou construto de metilação, conforme descrito aqui.

A presente invenção também proporciona um gene de metiltransferase híbrido (SEQ ID NO. 28) desenvolvido após análise de sequências de ácidos nucleicos de metiltransferase e sistemas de barreira de restrição de *C. autoethanogenum*, *C. ljungdahlii* e *C. ragsdalei*.

O gene de metiltransferase é expresso em um micro-organismo de transporte, o qual resulta na produção de uma enzima metiltransferase que metila a sequência do construto de expressão. O gene de metiltransferase pode estar presente em um construto ou integrado no genoma do micro-organismo de transporte. O gene de metiltransferase híbrido tem o códon otimizado para *E. coli* e pode ser incorporado em um construto de metilação (Figura 5). O gene de metiltransferase pode ter o códon otimizado para uso em outra espécie de micro-organismo se for o caso, por exemplo, *Bacillus subtilis*. Métodos para otimização de códons são padrões e serão conhecidos por aqueles versados na técnica (Carbone *et al.*, 2003). Também incorporados dentro do âmbito da invenção são genes de metiltransferase que têm pelo menos 70%, de preferência 75%, de preferência 80%, de preferência 85%, de preferência 90%, de preferência 95% ou mais de identidade de sequência de ácido nucleico à SEQ ID NO. 28 e expressam um polipeptídeo

que é capaz de metilar DNA.

Será apreciado por aqueles versados na técnica que o método de metilação do gene de metiltransferase terá utilidade em uma variedade de micro-organismos. Em uma modalidade, o micro-organismo de destino é selecionado do grupo que compreende *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium ragsdalei*, *Clostridium carboxidivorans*, *Clostridium drakei*, *Clostridium scatologenes*, *Butyribacterium limosum*, *Butyribacterium methylotrophicum*, *Acetobacterium woodii*, *Alkalibaculum bacchii*, *Blautia producta*, *Eubacterium limosum*, *Moorella thermoacetica*, *Moorella thermautotrophica*, *Oxobacter pfennigii* e *Thermoanaerobacter kiuvi*. Em uma modalidade particular, o micro-organismo de destino é selecionado do grupo que consiste *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii* e *Clostridium ragsdalei*. Em uma modalidade particular, o micro-organismo de destino é *Clostridium autoethanogenum* DSM23693.

A invenção também fornece vários ácidos nucleicos ou construtos de ácido nucleico, conforme descrito nos aspectos 4, 5, 14, 15, 16, 18, 19 e 21 da invenção descritos aqui antes.

Em outra modalidade da invenção, há um construto de expressão que compreende um ou mais ácidos nucleicos que codificam uma ou mais enzimas escolhidas de tiolase, de-hidrogenase de 3-hidroxi-butiril-CoA, Crotonase, de-hidrogenase de butiril-CoA e uma proteína de transferência de elétrons ou uma variante funcionalmente equivalente das mesmas. De preferência, a proteína de transferência de elétrons é Flavoproteína A de Transferência de Elétrons ou Flavoproteína B de Transferência de Elétrons. Em uma modalidade particular, tanto Flavoproteína A de Transferência de Elétrons quanto Flavoproteína B de Transferência de Elétrons estão incluídas no construto de expressão.

Informação de sequência exemplificativa para cada gene e enzima equivalente é fornecida no GenBank, conforme detalhado na Tabela 1 aqui depois. Aqueles versados na técnica apreciarão prontamente genes e enzimas alternativos os quais podem ser usados. Em uma modalidade, as enzimas são codificadas pelo ácido nucleico SEQ ID NO. 1 a 6, o qual pode

estar presente em qualquer ordem no construto ou na ordem mostrada na Figura 2. SEQ ID NO. 8 a 13 e NOS SEQ ID 16 a 23 são novas sequências usadas para clonar e sequenciar os genes mencionados no parágrafo imediatamente anterior.

5                   A fim de obter 1-butanol a partir de um precursor, atividade de uma ou mais de de-hidrogenase de butiraldeído (EC 1.2.1.10), desidrogenase de álcool (EC 1.1.1.1), fosfotransbutirilase (EC 2.3.1.19), quinase de butirato (EC 2.7.2.7), óxido-redutase de aldeído:ferredoxina (EC1.2.7.5) e desidrogenase álcool (EC 1.1.1.1): 2,7 podem ser requeridas. A desidrogenase  
10 de álcool da invenção é uma de-hidrogenase de butanol. Em determinadas modalidades, de-hidrogenase de butiraldeído (EC 1.2.1.10) e desidrogenase de álcool (EC 1.1.1.1) ou fosfotransbutirilase (EC 2.3.1.19), quinase de butirato (EC 2.7.2.7), óxido-redutase de aldeído:ferredoxina (EC 1.2.7. 5) e desidrogenase de álcool (EC 1.1.1.1) ou uma combinação de ambos os conjun-  
15 tos de enzimas é requerida. Em uma modalidade, a atividade de desidrogenase de butiraldeído e de-hidrogenase de butanol é conferida por uma de-hidrogenase de butiraldeído /de-hidrogenase de butanol bifuncional. Estas diversas enzimas são mostradas na via de biossíntese de butanol ilustrada na Figura 1. Em alguns micro-organismos, de-hidrogenase de butiraldeído,  
20 de-hidrogenase de butanol, fosfotransbutirilase, quinase de butirato e/ou óxido-redutase de aldeído: ferredoxina são naturalmente expressas pelo micro-organismo e, portanto, catalisam a conversão de butiril-CoA em 1-butanol.

Conseqüentemente, em uma modalidade, o construto de expressão compreende ácidos nucleicos que codificam uma ou mais de fosfo-  
25 transbutirilase, quinase de butirato, óxido-redutase de aldeído dependente de ferredoxina, de-hidrogenase de butiraldeído, de-hidrogenase de butanol e uma de-hidrogenase de butiraldeído /de-hidrogenase de butanol bifuncional, além de ou alternativamente a uma ou mais de tiolase, de-hidrogenase de 3-hidroxi-  
30 butiril-CoA, Crotonase, de-hidrogenase de butiril-CoA e uma proteína de transferência de elétrons.

Exemplos de enzimas e aminoácidos apropriados e informação de sequência de ácido nucleico que incluem, porém sem limitações: de-

hidrogenase de butiraldeído, tal como Ald de *C. beijerinckii* (ABR35947, GI: 149905114), *C. saccharobutylicum* (CAQ57983, GI: 189310620) ou *Clostridium saccharoperbutylacetoniucm* (AAP42563, GI: 31075383); dehidrogenase de butanol, tal como BdhB de *C. acetobutylicum* (NP\_349891, GI: 15896542); enzima bufuncional de-hidrogenase de butiraldeído/butanol, tal como AdhE1 de *C. acetobutylicum* (NP\_149325, GI: 15004865) ou AdhE2 de *C. acetobutylicum* (NP\_149199, GI: 15004739), *C. beijerinckii* (YP\_001307449, GI: 150015195); uma fosfotransbutirilase, tal como Ptb de *C. acetobutylicum* (NP\_348368); quinase de butirato, tal como Buk de *C. acetobutylicum* (AAK81015.1); óxido-redutase de aldeído:ferredoxina AOR de *C. acetobutylicum* (NP\_348637). Aqueles versados na técnica à qual a invenção se refere podem prontamente apreciar exemplos alternativos de enzimas adequadas para uso na invenção. Os inventores também identificaram uma série de novas enzimas e genes que podem ser usados na invenção, cujos detalhes são fornecidos aqui depois na seção Exemplos (em particular, vide Tabelas 7 e 10). A invenção também abrange variantes funcionalmente equivalentes destas enzimas e genes e seu uso em métodos da invenção.

A inclusão de um ou mais deste genes pode ajudar a evitar a co-produção de butirato completamente, aumentando a eficiência de produção de 1-butanol. A invenção também proporciona micro-organismos recombinantes compreendendo um ou mais ácidos nucleicos adaptados para expressar ou aumentar a expressão de uma ou mais destas enzimas.

Em uma modalidade, o(s) ácido(s) nucleico(s) codifica(m) uma enzima escolhida do grupo de enzimas listadas nas Tabelas 7 a 10 aqui depois e equivalentes funcionais de qualquer um ou mais dos mesmos. Em uma modalidade particular, os ácidos nucleicos são escolhidos do grupo de ácidos nucleicos nas Tabelas 7 a 10 aqui depois e equivalentes funcionais de qualquer um ou mais dos mesmos.

Em uma modalidade, o construto de expressão codifica pelo menos duas enzimas na via de biossíntese de butanol, pelo menos 3, pelo menos 4, pelo menos 5, pelo menos 6, pelo menos 7, pelo menos 8, pelo

menos 9, pelo menos 10, pelo menos 11 ou pelo menos 12 das enzimas.

De preferência, o construto de expressão compreende ainda um promotor adequado, conforme descrito aqui anteriormente. Em uma modalidade, o promotor é um promotor de butiril/acetil transferase de fosfato. De preferência, o promotor corresponde à SEQ ID NO. 7 ou uma variante funcionalmente equivalente da mesma.

Em uma modalidade preferida, o construto de expressão compreende um ácido nucleico que codifica todas as referidas enzimas. Será apreciado por aqueles versados na técnica que o construto de expressão pode compreender ácidos nucleicos que codificam proteínas de transferência de elétrons alternativas.

Os genes a serem expressos no micro-organismo recombinante podem ser montados no construto de expressão sob o controle de qualquer promotor adequado. Em uma modalidade particular, o promotor permite expressão substancialmente constitutiva dos genes sob seu controle. Em uma modalidade particular, o promotor é um promotor de butiril/acetil transferase de fosfato (SEQ ID NO. 7). Outros promotores que podem encontrar uso na presente invenção incluem aqueles de *C. autoethanogenum* (ou *C. ljungdahlii*). Os inventores também identificaram uma série de outros promotores que estão operativamente ligados a genes que foram altamente expressos sob condições típicas de fermentação em *Clostridium autoethanogenum* (Figura 8). Análise de expressão gênica sob mais de 200 condições de fermentação típicas usando PCR em tempo real identificou uma série de promotores apropriados. Estes incluem óxido-redutase de piruvato:ferredoxina (SEQ ID NO. 48), o agrupamento gênico de Wood-Ljungdahl (SEQ ID NO. 47), óperon Rnf (SEQ ID NO. 49) e óperon de sintase de ATP (SEQ ID NO. 50). Será apreciado por aqueles versados na técnica que outros promotores os quais podem dirigir a expressão, de preferência um alto nível de expressão sob condições apropriadas de fermentação, serão eficazes como alternativas às modalidades presentemente preferidas.

Em uma modalidade, a invenção compreende um construto, micro-organismo recombinante ou uma sequência de ácido nucleico que com-

preende ácido nucleico SEQ ID NOs. 1 a 6 na ordem mostrada na Figura 2. No entanto, será apreciado por aqueles versados na técnica que a invenção pode ainda ter a utilidade desejada quando as sequências de ácidos nucleicos são apresentadas em qualquer ordem e com uma ou mais das sequências ausentes.

5 Em outra modalidade, a invenção compreende um ácido nucleico que compreende a sequência promotora representada por SEQ ID NO. 7 ou uma variante funcionalmente equivalente da mesma, o construto compreendendo o referido promotor e micro-organismos recombinantes compreendendo as mesmas.

10 Será apreciado que um construto de expressão da presente invenção pode conter qualquer número de elementos reguladores, além do promotor, bem como genes adicionais adequados para expressão de outras proteínas, se desejado. Em uma modalidade, o construto compreende um promotor. Em outra modalidade, o construto compreende dois ou mais pro-

15 motores. Em uma modalidade particular, o construto inclui um promotor para com cada gene a ser expresso. Em uma modalidade, o construto compreende um ou mais sítios de ligação ribossômica, de preferência, um sítio de ligação ribossômica para cada gene a ser expresso.

20 Será apreciado por aqueles versados na técnica que as sequências de ácidos nucleicos e sequências de construto definidas aqui podem conter nucleotídeos ligantes convencionais, tais como aqueles requeridos para sítios de ligação ribossômica e/ou sítios de restrição. Tais sequências ligantes não devem ser interpretadas como sendo necessárias e não constituem uma limitação nas sequências definidas.

25 Quando o construto de expressão da presente invenção é expresso em um micro-organismo acetogênico, o micro-organismo produz 1-butanol ou um precursor do mesmo como o principal produto de fermentação. Considera-se que outros genes que codificam enzimas que catalisam

30 diversas etapas das vias de biossíntese de butanol ou Wood-Ljungdahl também podem ser incorporados no construto de expressão de modo a produzir 1-butanol como principal produto de fermentação.



Considera-se que o construto de expressão e o construto de metilação, conforme definido acima, podem ser combinados para proporcionar uma composição de matéria. Tal composição tem utilidade particular ao contornar mecanismos de barreira de restrição em uma ampla variedade de micro-organismos mas, em uma modalidade preferida, o micro-organismo recombinante produzido usando a composição produz 1-butanol ou um precursor do mesmo como o principal produto de fermentação.

Ácidos nucleicos e construtos de ácido nucleico, incluindo construtos de expressão, da presente invenção podem ser construídos usando qualquer número de métodos padrões na técnica. Por exemplo, podem ser usadas técnicas de síntese química ou recombinantes. Tais técnicas são descritas, por exemplo, em Sambrook *et al.* (1989). Outras técnicas exemplificativas são descritas na seção Exemplos aqui depois. Essencialmente, os genes individuais e elementos reguladores serão operativamente ligados uns aos outros, de modo que os genes possam ser expressos para formar as proteínas desejadas. Vetores adequados para uso na presente invenção serão apreciados por aqueles versados na técnica. No entanto, a título de exemplo, os vetores a seguir podem ser adequados: vetores de transporte pMTL80000, pIMP1 e pJIR750 e os plasmídeos exemplificados na seção Exemplos aqui depois.

Até o ponto em que a invenção proporciona novos ácidos nucleicos e vetores de ácidos nucleicos, ela também proporciona ácidos nucleicos os quais são capazes de hibridizar com pelo menos uma porção de um ácido nucleico descrito aqui, um ácido nucleico complementar a qualquer um dos mesmos ou uma variante funcionalmente equivalente de qualquer um dos mesmos. Tais ácidos nucleicos, de preferência, se hibridizarão com tais ácidos nucleicos, um ácido nucleico complementar a qualquer um dos mesmos ou uma variante funcionalmente equivalente de qualquer um dos mesmos sob condições de hibridização estringentes. "Condições de hibridização estringentes" significa que o ácido nucleico é capaz de hibridizar a um modelo-alvo sob condições de hibridização convencionais, tais como aquelas descritos em Sambrook *et al.* (1989). Será apreciado que o tamanho mínimo de

tais ácidos nucleicos é um tamanho o qual é capaz de formar um híbrido estável entre um determinado ácido nucleico e a sequência complementar à qual se deseja que ele hibridize. Conseqüentemente, o tamanho é dependente da composição de ácido nucleico e homologia percentual entre o ácido nucleico e sua sequência complementar, bem como das condições de hibridização que são usadas (por exemplo, temperatura e concentração de sal).  
5 Em uma modalidade, o ácido nucleico tem pelo menos 10 nucleotídeos de comprimento, pelo menos 15 nucleotídeos de comprimento, pelo menos 20 nucleotídeos de comprimento, pelo menos 25 nucleotídeos de comprimento  
10 ou pelo menos 30 nucleotídeos de comprimento.

Deverá ser notado que os ácidos nucleicos da invenção podem estar em qualquer forma adequada, incluindo RNA, DNA ou cDNA, incluindo ácidos nucleicos fita dupla e fita simples.

A invenção também proporciona organismos hospedeiros, particularmente micro-organismos, incluindo vírus e bactérias e leveduras, compreendendo qualquer um ou mais dos ácidos nucleicos descritos aqui.  
15

A invenção proporciona um método de produção de 1-butanol e/ou um precursor do mesmo por meio de fermentação microbiana que compreende fermentação de um substrato gasoso compreendendo CO<sub>2</sub> usando um micro-organismo recombinante. Em determinadas modalidades, 1-butanol ou um precursor do mesmo é co-produzido com outro produto de fermentação (por exemplo, etanol). Em uma modalidade, 1-butanol ou um precursor do mesmo é o principal produto de fermentação. Em uma modalidade, o micro-organismo recombinante é conforme aqui anteriormente descrito.  
20  
25

Em uma modalidade, 1-butanol e/ou um precursor do mesmo é produzido em um rendimento de aproximadamente de 0,075 g por litro de caldo de fermentação ( g/l) a aproximadamente 20 g/l. Em uma modalidade, o rendimento é aproximadamente 0,15 g/l a aproximadamente 1,54 g/l. Em outras modalidades, o rendimento é aproximadamente 10 g/l, aproximadamente 5 g/l ou aproximadamente 2 g/l. De preferência, o rendimento de 1-butanol é até o limite no qual o butanol se torna tóxico para as bactérias.  
30

De preferência, a fermentação compreende as etapas de fermentação anaeróbia de um substrato em um biorreator para a produção de 1-butanol e/ou um precursor do mesmo usando micro-organismos recombinantes, conforme descrito aqui.

5                   Onde o precursor de 1-butanol é referido aqui, considera-se que ele pode ser opcionalmente convertido em 1-butanol na presença de de-hidrogenase de butiraldeído, de-hidrogenase de butanol, uma de-hidrogenase de butiraldeído /de-hidrogenase de butanol bifuncional, fosfo-transbutirilase, quinase de butirato e/ou óxido-redutase de aldeído dependente de ferredoxina. De preferência, o micro-organismo produz uma ou  
10                   mais destas enzimas, tanto antes quanto após introdução de um ácido nucleico recombinante.

                    Em uma modalidade da invenção, o substrato gasoso fermentado pelo micro-organismo é um substrato gasoso contendo CO. O substrato  
15                   gasoso pode ser um gás residual contendo CO obtido como um subproduto de um processo industrial ou de outra fonte, tais como de gases de escape de automóveis. Em determinadas modalidades, o processo industrial é selecionado do grupo que consiste em fabricação de produtos de metal  
20                   ferroso, tal como usinagem de aço, fabricação de produtos não-ferrosos, processos de refino de petróleo, gaseificação de carvão, produção de energia elétrica, produção de negro de carbono, produção de amônia, produção de metanol e fabricação de coque. Nestas modalidades, o gás contendo CO  
25                   pode ser capturado do processo industrial antes de ser emitido para a atmosfera usando qualquer método conveniente. O CO pode ser um componente de syngas (gás compreendendo monóxido de carbono e hidrogênio).  
O CO produzido a partir de processos industriais é normalmente queimado para produzir CO<sub>2</sub> e, portanto, a invenção tem utilidade particular na redução da emissão de gases de efeito de estufa CO<sub>2</sub> e produção de butanol para  
30                   uso como biocombustível. Dependendo da composição do substrato gasoso contendo CO, pode também ser desejável tratá-lo para remover quaisquer impurezas indesejadas, tais como partículas de poeira, antes de introdução do mesmo na fermentação. Por exemplo, o substrato gasoso pode ser filtra-

do ou purificado usando métodos conhecidos.

Será apreciado que, para que crescimento das bactérias e fermentação de CO em 1-butanol ocorram, além do substrato gasoso contendo CO, em um meio nutriente líquido adequado deverá ser alimentado ao biorreator. Um meio nutriente conterá vitaminas e minerais suficientes para permitir o crescimento do micro-organismo usado. Meios adequados para fermentação anaeróbia para produção de butanol usando CO são conhecidos na técnica. Por exemplo, meios adequados são descritos em Biebel (2001). Em uma modalidade da invenção, o meio é conforme descrito na seção Exemplos aqui depois.

A fermentação deverá, desejavelmente, ser realizada sob condições adequadas para que fermentação de CO em butanol ocorra. Condições de reação que devem ser consideradas incluem pressão, temperatura, taxa de fluxo de gás, taxa de fluxo de líquido, o pH do meio, potencial redox do meio, taxa de agitação (se usando um reator de tanque agitado contínuo), nível de inóculo, concentrações máximas de substrato gasoso para assegurar que o CO na fase líquida não se torne limitativo e concentrações máximas de produto para evitar inibição de produto.

Além disso, é muitas vezes desejável aumentar a concentração de CO de uma corrente de substrato (ou pressão parcial de CO em um substrato gasoso) e, assim, aumentar a eficiência de reações de fermentação onde CO é um substrato. Operação em maiores pressões permite um aumento significativo na taxa de transferência de CO da fase gasosa para a fase líquida, onde ele pode ser captado pelo micro-organismo como fonte de carbono para a produção de butanol. Isto, por sua vez, significa que o tempo de retenção (definido como o volume de líquido no biorreator dividido pela taxa de fluxo de gás de entrada) pode ser reduzido quando biorreatores são mantidos em uma pressão elevada, ao invés de em pressão atmosférica. As condições de reação ótimas dependerão, em parte, do micro-organismo da invenção usado em particular. No entanto, em geral, é preferido que a fermentação seja realizada em uma pressão maior do que a pressão ambiente. Além disso, uma vez que uma determinada taxa de conversão de CO em

butanol é, em parte, uma função do tempo de retenção do substrato e obtenção de um tempo de retenção desejado, por sua vez, determina o volume necessário de um biorreator, o uso de sistemas pressurizados pode reduzir consideravelmente o volume do biorreator necessário e, conseqüentemente, o custo do capital com equipamento de fermentação. De acordo com os exemplos fornecidos na Patente US N° 5.593.886, volume do reator pode ser reduzido em proporção linear a aumentos na pressão de operação do reator, isto é, biorreatores operados a 10 atmosferas de pressão precisam apenas de um décimo do volume daqueles operados a 1 atmosfera de pressão.

Os benefícios de conduzir uma fermentação de gás em etanol em pressões elevadas foi descrito em outro lugar. Por exemplo, o documento WO 02/08438 descreve fermentações de gás em etanol realizadas sob pressões de 30 psi e 75 psi, proporcionando produtividades de etanol de 150 g//dia e 369 g//dia, respectivamente. No entanto, descobriu-se que fermentações exemplificativas realizadas usando meios e composições de gás de entrada similares em pressão atmosférica produzem entre 10 e 20 vezes menos etanol por litro por dia.

A composição das correntes gasosas usados para alimentar uma reação de fermentação pode ter um impacto significativo sobre a eficácia e/ou custos desta reação. Por exemplo, O<sub>2</sub> pode diminuir a eficiência de um processo de fermentação anaeróbia. Processamento de gases indesejados ou desnecessários em estágios de um processo de fermentação antes ou após fermentação pode aumentar a carga sobre tais estágios (por exemplo, onde a corrente gasosa é comprimida antes de entrar em um biorreator, energia desnecessária pode ser usada para comprimir gases que não são necessários na fermentação). Conseqüentemente, pode ser desejável tratar as correntes de substrato, particularmente correntes de substrato derivadas de fontes industriais, para remover componentes indesejáveis e aumentar a concentração de componentes desejáveis.

Em determinadas modalidades, uma cultura de uma bactéria da invenção é mantida em um meio de cultura aquoso. De preferência, o meio de cultura aquoso é um meio mínimo de crescimento microbiano anaeróbio.

Meios adequados são conhecidos na técnica e descritos, por exemplo, nas Patentes US N<sup>os</sup> 5.173.429 e 5.593.886 e documento WO 02/08438 e como descrito na seção Exemplos aqui depois.

5 Butanol ou uma corrente mista de álcool contendo butanol e um ou mais de outros álcoois podem ser recuperados do caldo de fermentação por meio de métodos conhecidos na técnica, tais como destilação fracionada ou evaporação, pervaporação e fermentação extrativa incluindo, por exemplo, extração de líquido-líquido. Subprodutos, tais como ácidos, incluindo butirato, podem também ser recuperados do caldo de fermentação usando  
10 métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, pode ser usado um sistema de adsorção que envolve um filtro de carvão ativado ou eletrodialise. Alternativamente, a extração contínua de gás também pode ser usada.

Em determinadas modalidades preferidas da invenção, butanol e subprodutos são recuperados do caldo de fermentação por meio de remoção  
15 contínua de uma parte do caldo do biorreator, separação de células microbianas do caldo (convenientemente por meio de filtração) e recuperação de butanol e, opcionalmente, ácido do caldo. Álcoois podem, convenientemente, ser recuperados, por exemplo, por meio de destilação e ácidos podem ser recuperados, por exemplo, por meio de adsorção sobre carvão ativado.  
20 As células microbianas separadas são, de preferência, retornadas ao biorreator de fermentação. O permeado sem células remanescente após o(s) álcool(is) e ácido(s) serem removidos também é, de preferência, retornado ao biorreator e fermentação. Nutrientes adicionais (tais como vitaminas B) podem ser adicionado ao permeado sem células para repor o meio nutriente  
25 antes que ele seja retornado ao biorreator.

Também, se o pH do caldo foi ajustado conforme descrito acima para aumentar a adsorção de ácido acético ao carvão ativado, o pH deve ser novamente ajustado para um pH similar àquele do caldo no biorreator de fermentação antes de ser retornado ao biorreator.

30 Em uma modalidade da invenção, butanol é recuperado da reação de fermentação usando procedimentos de fermentação extrativa nos quais butanol é recuperado em uma fase oleosa no reator. Aqueles versados

na técnica apreciarão prontamente técnicas para obter isto.

### EXEMPLOS

A invenção será agora descrita em maiores detalhes com referência aos exemplos não limitativos a seguir.

- 5                    Modificações genéticas foram realizadas usando um plasmídeo contendo um óperon sintético que consiste em um promotor forte nativo de *C. autoethanogenum* que controla genes de tiolase, de-hidrogenase de 3-hidroxibutiril-CoA, crotonase, de-hidrogenase de butiril-CoA e duas flavoproteínas de transferência de elétrons de *C. acetobutylicum* (Fig. 1-2). Este
- 10 plasmídeo foi metilado *in vivo* usando uma nova metiltransferase e, então, transformado em *C. autoethanogenum* DSM23693. Produção de 1-butanol como o principal produto da fermentação foi mostrada em diferentes correntes de gás industrial (efluentes gasosos de usinagem de aço, syngas).

#### Construto de Plasmídeo de Expressão:

- 15                    Técnicas padrões de clonagem molecular e DNA recombinante foram usadas na presente invenção e são descritas por Sambrook *et al.*, 1989 e Ausubel *et al.*, 1987. Sequências de DNA de genes de biossíntese de butanol de *Clostridium acetobutylicum* ATCC824 usadas foram obtidas do NCBI (Tabela 1). O promotor do óperon de quinase de acetato/fosfotransacetilase de *C. autoethanogenum* DSM10061 foi sequenciado e
- 20 usado para expressão de genes-alvo (Tabela 1). Experimentos de RT-PCR mostraram que este promotor é constitutivamente expresso em alto nível (Figura 8).

Tabela 1: Fontes de Genes de Vias 1-butanol

Gene/Promotor	Citação no GenBank	SEQ_ID NO.
Tiolase ( <i>thlA</i> )	NC_003030 <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824, genoma completo; GI:15896127; GeneID:1119056	1
De-hidrogenase de 3-hidroxibutiril-CoA ( <i>hbd</i> )	NC_003030 <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824, genoma completo; GI:15895965; GeneID:1118891	2
Crotonase ( <i>crt</i> )	NC_003030 <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824, genoma completo; GI:15895969; GeneID:1118895	3
De-hidrogenase de butiril-CoA ( <i>bcd</i> )	NC_003030 <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824, genoma completo; GI:15895968; GeneID:1118894	4
Flavoproteína A de Transferência de Elétrons ( <i>effA</i> )	NC_003030 <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824, genoma completo; GI:15895966; GeneID:1118892	5
Flavoproteína B de Transferência de Elétrons ( <i>effB</i> )	NC_003030 <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824, genoma completo; GI:15895967; GeneID:1118893	6
Promotor de quinase de acetato/fosfotransacetilase ( <i>P<sub>pta-ack</sub></i> )	<i>Clostridium autoethanogenum</i> DSM10061	7

DNA genômico de *Clostridium acetobutylicum* ATCC824 e *Clostridium autoethanogenum* DSM10061 foi isolado usando um método modificado por Bertram e Dürre (1989). Uma cultura noturna de 100 ml foi coletada

5 (6.000 x g, 15 min, 4 °C), lavada com tampão de fosfato de potássio (10 mM, pH de 7,5) e suspensa em 1,9 ml de tampão STE (EDTA a 1 mM, Tris-HCl a 50 mM, 1, sacarose a 200 mM, pH de 8,0). 300 µl de lisozima (~ 100.000 U) foram adicionados e a mistura foi incubada a 37 °C durante 30 min, seguido

10 pela adição de 280 µl de uma solução de SDS a 10% (peso/v) e outra incubação durante 10 min. O RNA foi digerido em temperatura ambiente mediante a adição de 240 µl de uma solução de EDTA (0,5 M, pH de 8), 20 µl de Tris-HCl (1 M, pH de 7,5) e 10 µl de RNase A (Fermentas). Então, 100 µl de proteinase K (0,5 L) foram adicionados e proteólise foi realizada durante 1-3



horas a 37 °C. Finalmente, 600 µl de perclorato de sódio (5 M) foram adicionados, seguido por uma extração com fenol-clorofórmio e precipitação com isopropanol. A quantidade e qualidade do DNA foram verificadas por meio de espectrofotometria.

- 5 Genes da biossíntese de butanol e o promotor de quinase de acetato/fosfoacetilase foram amplificados por PCR com os oligonucleotídeos na Tabela 2 usando DNA polimerase iProof High Fidelity (Bio-Rad Laboratories) e programa a seguir: desnaturação inicial a 98°C durante 30 segundos, seguido por 32 ciclos de desnaturação (98°C durante 10 segundos), 10 anelamento (50-62°C durante 30-120 segundos) e alongamento (72°C durante 45 segundos) antes de uma etapa final de extensão (72°C durante 10 minutos).

Tabela 2: Oligonucleotídeos para Clonagem

Alvo	Nome do Oligonucleotídeo	Sequência de DNA (5' para 3')	SEQ_ID NO.
Ppta-ack	Ppta-ack-NotI-F	GAGCGGCCGCAA-TATGATATTTATGTCC	8
Ppta-ack	Ppta-ack-NdeI-R	TTCCATATGTTT-CATGTTCAATTCCTCC	9
ThIA	ThIA-Cac-NdeI-F	GTTCCATATGAAAGA-AGTTGTAATAGC	10
ThIA	ThIA-Cac-EcoRI-R	CAAGAATTCCTAG-CACTTTTCTAGC	11
crt-bcd-ettB-ettA-hbd operon	Crt-Cac-KpnI-F	AAGGTACCTTAG-GAGGATTAGTCATGG	12
crt-bcd-ettB-ettA-hbd operon	Crt-hbd-Cac-BamHI-R	GAGGATCCG-GATTCTTGTAAACT-TATTTTG	13

- 15 A região promotora de 498 bp amplificada do óperon de quinase de acetato/fosfoacetilase ( $P_{pta-ack}$ ) foi clonada no vetor de transporte de *E. coli-Clostridium* pMTL 85141 (SEQ ID 14; FJ797651.1; Nigel Minton, University of Nottingham; Heap *et al.*, 2009) usando sítios de restrição *NotI* e *NdeI* e a cepa DH5 $\alpha$ -T1<sup>R</sup> (Invitrogen). O plasmídeo pMTL85145 criado e o produto de PCR de 1.194 bp do gene de tiolase foram ambos cortados com

*NdeI* e *EcoRI*. A ligação foi transformada em *E. coli* XL1-Blue MRF' Kan (Stratagene), resultando no plasmídeo pMTL85145-thIA. Subsequentemente, o fragmento de 4.764 bp amplificado por PCR do óperon *crt-bcd-ettB-ettA-hbd* de *C. acetobutylicum* ATCC 824 foi clonado neste vetor usando *KpnI* e *Bam*HI e *E. coli* ABLE K (Stratagene), criando o plasmídeo pMTL85145-thIA-crt-hbd. Finalmente, o cassete de resistência a antibióticos foi mudado de cloranfenicol para claritromicina. Portanto, um cassete *ermB* foi liberado do vetor pMTL82254 (SEQ ID 15; FJ797646.1; Nigel Minton, University of Nottingham; Heap *et al.*, 2009) usando as enzimas de restrição *PmeI* e *FseI* e trocado por um cassete *catP* de plasmídeo pMTL85145-thIA-crt-hbd. O inserto do plasmídeo de expressão resultante, pMTL85245-thIA-crt-hbd (SEQ ID NO. 31), foi completamente sequenciado usando os oligonucleotídeos fornecidos na Tabela 3 e os resultados confirmaram que os genes de biossíntese de butanol estavam livres de mutações (Figura 3).

15 Tabela 3: Oligonucleotídeos para Sequenciamento

Nome do Oligonucleotídeo	Sequência de DNA (5' para 3')	SEQ ID NO
seq-ThIA-hbd-3562-4162	CAGAGGATGTTAATGAAGTC	16
seq-ThIA-hbd-4163-4763	GCATCAGGATTAATGACTG	17
seq-ThIA-hbd-4764-5364	ATAGCGAAGTACTTG	18
seq-ThIA-hbd-5365-5965	GATGCAATGACAGCTTTC	19
seq-ThIA-hbd-5966-6566	GGAACAAAAGGTATATCAGC	20
seq-ThIA-hbd-7168-7768	CGGAGCATTGATAAAGAA	21
seq-ThIA-hbd-7769-8369	GCTGATTGTACATCACTTGA	22
seq-ThIA-hbd-8370-8870	CCAGAATTAATAGCTCAAGT	23

#### Metilação de DNA:

Um gene híbrido de metiltransferase fundido a um promotor *lac* induzível foi concebido (SEQ ID 28) por meio de alinhamento de genes de metiltransferase de *C. autoethanogenum* (SEQ ID NO. 24), *C. ljungdahlii* (SEQ ID NO. 25) e *C. ragsdalei* (SEQ ID NO. 26) (Figuras 4a, 4b e 4c). Expressão do gene de metiltransferase resultou na produção de uma enzima metiltransferase de acordo com SEQ ID NO. 28. Dados de alinhamento da sequência de aminoácido de metiltransferase são mostrados na Figura 4d. O

gene híbrido de metiltransferase (SEQ ID NO. 27) foi sintetizado quimicamente e clonado no vetor pGS20 (SEQ ID 29; ATG:biosynthetics GmbH, Merzhausen, Alemanha) usando *EcoRI* (Fig. 5). O plasmídeo de metilação resultante pGS20-metiltransferase foi duplamente transformado com o plasmídeo de expressão pMTL85245-thIA-crt-hbd em *E. coli* XL1-Blue MRF' Kan restrição-negativa (Stratagene). Metilação *in vivo* foi induzida mediante a adição de IPTG a 1 mM e os plasmídeos metilados foram isolados usando o kit PureLink™ HiPure Plasmid Maxiprep (Invitrogen). A composição do plasmídeo metilado resultante foi usada para transformação de *C. autoethanogenum* DSM23693.

#### Transformação:

Durante o experimento de transformação completa, *C. autoethanogenum* DSM23693 e *C. ljundahlii* (DSM13528) foram cultivados em meio PETC (Tab. 4), com 10 g/l de frutose e gás residual de usinagem de aço a 30 (coletado da New Zealand Steel Site em Glenbrook, NZ; composição: 44% de CO, 32% de N<sub>2</sub>, 22% de CO<sub>2</sub> e 2% de H<sub>2</sub>) como fonte de carbono a 37 °C usando técnicas anaeróbias padrões descritas por Hungate (1969) e Wolfe (1971).

Tabela 4: Meio PETC (Meio ATCC 1754;

<http://www.atcc.org/Attachments/2940.pdf>

Componente do Meio	Concentração por 1,0L de Meio
NH <sub>4</sub> Cl	1 g
KCl	0,1 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2 g
NaCl	0,8 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1 g
CaCl <sub>2</sub>	0,02 g
Solução de metal residual	10 ml
Solução de vitamina de Wolfe	10 ml
Extrato de levedura	1 g
Resazurina (estoque a 2 g/L)	0,5 ml
NaHCO <sub>3</sub>	2 g
Agente de redução	0,006-0,008 % (v/v)
Água destilada	Até 1 L, pH de 5,5 (ajustado com HCl)

Solução de vitamina de Wolfe	por L de Estoque
Biotina	2 mg
Ácido fólico	2 mg
Cloridrato de piridoxina	10 mg
Tiamina.HCl	5 mg
Riboflavina	5 mg
Ácido nicotínico	5 mg
D-(+)-pantotenato de cálcio	5 mg
Vitamina B <sub>12</sub>	0,1 mg
Ácido p-aminobenzoico	5 mg
Ácido tióctico	5 mg
Água destilada	Até 1 L

Solução de metal residual	por L de Estoque
Ácido nitrilotriacético	2 g
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	1 g
Fe (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,8 g
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,2 g
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2 mg
CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,02 g
NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,02 g
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	0,02 g
NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,02 g
Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,02 g
Água destilada	Até 1 L

Estoque de Agente de Redução	por 100 mL de Estoque
NaOH	0,9 g
Cisteína.HCl	4 g
Na <sub>2</sub> S	4 g
Água destilada	Até 100 mL

- Para fazer células competentes, uma cultura de 50 ml de *C. autoethanogenum* DSM23693 e uma cultura de 50 ml de *C. ljundahlii* DSM13528 foram subcultivadas em meio fresco durante 3 dias consecutivos.
- 5 Estas células foram usadas para inocular 50 ml de meio PETC contendo DL-

treonina a 40 mM em uma OD<sub>600</sub> nm de 0,05. Quando a cultura atingiu uma OD<sub>600</sub> nm de 0,4, as células foram transferidas para uma câmara anaeróbia e coletadas a 4.700 x g e 4 °C. A cultura foi lavada duas vezes com tampão de eletroporação gelado (sacarose a 270 mM, MgCl<sub>2</sub> a 1 mM, fosfato de sódio a 7 mM, pH de 7,4) e finalmente suspensa em um volume de 600 µl de tampão de eletroporação fresco. Esta mistura foi transferida para uma cubeta de eletroporação pré-resfriada com um vão de eletrodo de 0,4 cm contendo 1 µg da mistura de plasmídeo metilado (e, no caso de *C. ljundahlii*, 1 µl de Type 1 Restriction Inhibitor (Epicentre Biotechnologies)) e imediatamente condicionada usando sistema de eletroporação Gene Pulser Xcell (Bio-Rad) com as configurações a seguir: 2,5 kV, 600 Ω e 25 µF. Constantes de tempo de 3,7-4,0 ms foram obtidas. A cultura foi transferida para 5 ml de meio fresco. Regeneração das células foi monitorada em um comprimento de onda de 600 nm usando um espectrofotômetro Spectronic Helios Epsilon (Thermo) equipado com um suporte de tubo. Após uma queda inicial na biomassa, as células começam a crescer de novo. Uma vez que a biomassa dobrou a partir desse ponto, as células foram coletadas, suspensas em 200 µl de meio fresco e cultivadas em placas PETC seletivas (contendo agar Bacto™ a 1,2% (BD)) com 4 µg/µl de Claritromicina. Após 4-5 dias de inoculação com gás de usinagem de aço a 30 psi a 37 °C, 15-80 colônias por placa eram claramente visíveis.

As colônias foram usadas para inocular 2 ml de meio PETC contendo 4 µg/mL de Claritromicina. Quando ocorreu um crescimento, a cultura foi escalonada em 5 ml e, depois, 50 ml de meio PETC contendo 4 µg/mL de Claritromicina e gás de usinagem de aço a 30 psi como única fonte de carbono.

#### Confirmação de Transformação Com Sucesso:

*C. autoethanogenum*: Para verificar a transferência de DNA, um plasmídeo mini prep foi realizado a partir de um volume de cultura de 10 ml cultura usando o kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen). Em virtude da atividade de exonuclease Clostridial (Burchhardt e Dürre, 1990), o DNA de plasmídeo isolado de 4 clones analisados foi parcialmente degradado e resultou apenas

em uma mancha em um gel de agarose, enquanto que o isolamento de plasmídeos da cepa *C. autoethanogenum* DSM23693 original não resulta em um sinal em geral (Fig. 6). No entanto, a qualidade do DNA de plasmídeo isolado foi suficiente para executar uma PCR de controle usando quatro conjuntos de iniciadores, abrangendo todas as diferentes regiões relevantes do plasmídeo (Tabela 5). A PCR foi realizada com Illustra PuReTaq Ready-To-Go™ PCR Beads (GE Healthcare) usando uma condições padrões (95 °C durante 5 min; 32 ciclos de 95 °C durante 30 s, 50 °C durante 30 s e 72 °C durante 1 min; 72 °C durante 10 min.) PCR de todos os quatro transformantes analisados resultou nos mesmos sinais que a mistura de plasmídeo metilado original como modelo (Fig. 6). Como um controle adicional, 1 µl de cada um dos plasmídeos isolados parcialmente degradadas foi re-transformado em *E. coli* XL1-Blue MRF' Kan (Stratagene), de onde os plasmídeos puderam ser isolados de forma limpa e verificados através de digestões por restrição.

Para confirmar a identidade dos quatro clones, o DNA genômico foi isolado (vide acima) de 40 ml de cada cultura e uma PCR foi realizada contra o gene de rRNA 16S (Tab. 5; Weisberg *et al.*, 1991) usando Illustra PuReTaq Ready-To-Go™ PCR Beads (GE Healthcare) e condições padrões (95 °C durante 5 min; 32 ciclos de 95 °C durante 30 s, 50 °C durante 30 s e 72 °C durante 1 min; 72 °C durante 10 min). Os respectivos produtos de PCR foram purificados e sequenciados. As sequências de todos os clones mostraram pelo menos 99,9% de identidade em relação ao gene de rRNA 16S de *C. autoethanogenum* (SEQ ID 30; Y18178, GI: 7271109).

A respectiva cepa foi depositada no DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Alemanha) sob o número de acesso DSM24138 em 26 de Outubro de 2010.

*C. ljungdahlii*: Transformantes de *Clostridium ljungdahlii* foram confirmados usando o mesmo método e conjuntos de iniciadores. Sequenciamento do gene de rRNA 16S resultou em uma combinação de 100% com o gene 16S de *Clostridium ljungdahlii* (SEQ ID 119; CP001666, GI: 300433347).

**Tabela 5: Oligonucleotídeos para Confirmação por PCR de Plasmídeo e Espécie**

Região-alvo	Nome do oligonucleotídeo	Sequência de DNA (5' para 3')	Seq ID No.
gene de rRNA 16S	fD1	CCGAATTCGTCGACAA-CAGAGTTT-GATCCTGGCTCAG	135
gene de rRNA 16S	rP2	CCCGGGATCCAAGCT-TACGGCTACCTTGT-TACGACTT	32
Cassete de resistência a antibióticos ( <i>ermB</i> )	ermB-F	TTTGTAAATTAAGAAG-GAG	33
Cassete de resistência a antibióticos ( <i>ermB</i> )	ermB-R	GTAGAATCCTTCTTCA-AC	34
Inserto 1 ( <i>thIA</i> )	ThIA-Cac-NdeI-F	GTTTCATATGAAAGA-AGTTGTAATAGC	10
Inserto 1 ( <i>thIA</i> )	ThIA-Cac-EcoRI-R	CAAGAATTCCTAG-CACTTTTCTAGC	11
Inserto 2 ( <i>crt-bcd- effAB-hbd</i> )	Crt-conservado-F	GCTGGAGCAGATAT	35
Inserto 2 ( <i>crt-bcd- effAB-hbd</i> )	Crt-conservado-R	GCTGTCATTCCTTC	36
Origem de replicação (ColE1)	ColE1-F	CGTCAGACCCCGTAGA-AA	37
Origem de replicação (ColE1)	ColE1-R	CTCTCCTGTTCC-GACCCT	38

**Produção de 1-butanol:**

- Para demonstrar a produção de 1-butanol a partir de CO como
- 5 única fonte de carbono e energia, meio PETC sem extrato de levedura e frutose foi preparado e inoculado com as novas cepas de *C. autoethanogenum* e *C. ljungdahlii* abrigoando o plasmídeo de butanol pMTL85245-thIA-crt-hbd. Garrafas foram pressurizadas com 30 psi de uma corrente gasosa contendo CO a partir de duas fontes industriais, efluxo gasoso de usinagem de aço
- 10 (coletado de New Zealand Steel Site em Glenbrook, NZ, composição: 44% de CO, 32% de N<sub>2</sub>, 22% de CO<sub>2</sub>, 2% de H<sub>2</sub>) e syngas (Range Fuels Inc., Broomfield, CO; composição: 29% de CO, 45% de H<sub>2</sub>, 13% de CH<sub>4</sub>, 12% de CO<sub>2</sub>, 1% de N<sub>2</sub>). Produção de 1-butanol pôde ser demonstrada com ambas as cepas e ambas as misturas gasosas ao longo de vários períodos de sub-

cultura. Co-produção de butirato foi observado também. Nem 1-butanol nem butirato foram detectados em amostras de cepas não modificadas de *C. autoethanogenum* DSM23693 e *C. ljungdahlii* DSM13528 sob as mesmas condições.

5                   Análise de metabólitos foi realizada por HPLC usando um sistema de HPLC Agilent 1100 Series equipado com um RID (Refractive Index Detector - Detector de Índice de Refração) operado a 35 °C e uma coluna de ácido orgânico Alltech IOA-2000 (150 x 6,5 mm, tamanho de partícula de 5 µm) mantido a 60 °C. Foi usada água ligeiramente acidificada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 10 0,005 M) como fase móvel com uma taxa de fluxo de 0,7 ml/min. Para eliminar as proteínas e outros resíduos celulares, 400 µl de amostras foram misturados com 100 µl de uma solução de ácido 5-sulfo-salicílico a 2% (peso/v) e centrifugado a 14.000 x g durante 3 minutos para separar os resíduos precipitados. 10 µl do sobrenadante foram, então, injetados no HPLC para análise. 15 lise.

Em experimentos com garrafa de soro foi observada a maior produção de 1-butanol em duas culturas estáticas de *C. autoethanogenum* abrigoando o plasmídeo de butanol pMTL85245-thlA-crt-hbd. Nestas culturas, 1-butanol foi o principal produto final da fermentação observado, com 1,54 20 g/l (25,66 mm) (Tabela 6, FIG. 7). A produção de outros metabólitos foi reduzida em comparação com a cepa original de *C. autoethanogenum* DSM23693, a qual produziu apenas etanol, acetato e 2,3-butanodiol. Embora o fluxo de carbono fosse desviado para a produção de 1-butanol, a quantidade total de carbono incorporado nos produtos metabólicos finais permaneceu praticamente a mesma (Tabela 6). É provável que o ligeiro aumento 25 de 20% seja o resultado de descarga extra de equivalentes de redução para a produção de 1-butanol e butirato comparado com etanol e acetato, respectivamente. A produção de 2,3-butanodiol, o qual usualmente atua como dissipador de elétrons, foi completamente reduzida.



Tabela 6: Produção de Metabólitos e Equilíbrio de Carbono de *C. autoethanogenum* Abrigando o Plasmídeo de Butanol pM-TL85245-thIA-crt-hbd Comparado com *C. autoethanogenum* DSM23693 Original

Produto	M [g/mol]	P [g/cm <sup>3</sup> ]	Átomos de carbono	<i>C. autoethanogenum</i> DSM23693 Ori- ginal			<i>C. autoethanogenum</i> DSM23693 + pMTL85245-thIA-crt-bcd		
				Produto [g/l]	Produto [mmol/l]	Carbono [mmol/l]	Produto [g/l]	Produto [mmol/l]	Carbono [mmol/l]
Etanol	46,08	0,789	2	1,02	28,06	56,11	0,37	10,18	20,35
Acetato	60,05	1,049	2	1,87	29,69	59,37	0,30	4,76	9,52
2,3-butandiol	90,12	0,987	4	0,18	2,02	8,09	0	0	0
1-butanol	74,12	0,810	4	0	0	0	1,54	25,66	102,63
Butirato	88,11	0,960	4	0	0	0	0,31	3,67	14,67
Total						123,58			147,17

Produção de 1-butanol também foi observada em culturas de *C. ljungdahlii* DSM13528 abrigando o plasmídeo de butanol pMTL85245-thIA-crt-hbd em quantidades significativas de até 0,36 g/l (6 mM), embora inferior ao *C. autoethanogenum* DSM23693 abrigando o mesmo plasmídeo. Isto pode ser explicado porque *C. autoethanogenum* DSM23693 é uma cepa com produção aprimorada de álcool e, correspondentemente, a cepa não modificada de *C. autoethanogenum* DSM23693 produz mais etanol e menos acetato do que a cepa não modificada de *C. ljungdahlii* DSM13528 (ambas as cepas não produzem butanol nem butirato).

*C. ljungdahlii* abrigando o plasmídeo de butanol pMTL85245-thIA-CRT-hbd teve uma proporção de 1-butanol:butirato do que *C. autoethanogenum*. A proporção de 1-butanol para butirato, no entanto, pode ser alterada pelas condições de processo. Isto permite a produção de 1-butanol como o principal produto da fermentação, mas também a produção de butirato como o principal produto da fermentação em ambas as cepas *C. autoethanogenum* e *C. ljungdahlii*. Em experimentos com frasco de soro, proporções molares de 1-butanol:butirato entre 50:1 a 1:30 foram observadas com *C. autoethanogenum* e 20:1-1:30 com *C. ljungdahlii*. Culturas as quais foram incubadas sob agitação produziram geralmente maiores níveis de butirato e menores níveis de 1-butanol comparado com culturas estáticas. Descobriu-se que a concentração de CO (e H<sub>2</sub>) no *headspace* tinha um efeito sobre a proporção de 1-butanol:butirato também. Em culturas com menos CO no *headspace*, a produção de butirato era mais favorecida e ele pôde ser produzido como o principal produto de fermentação. Correspondentemente, titulações mais altas de 1-butanol foram observadas com o gás de usinagem de aço rico em CO (44% de CO) do que no syngas pobre em CO (29% de CO) em experimentos realizados em frasco de soro. Um máximo de 1,08 g/l (12,8 mM) de butirato foi observado com *Clostridium autoethanogenum* abrigando um plasmídeo pMTL85245-thIA-crt-hbd e um nível de 1,03 g/l (12,5 mM) com *C. ljungdahlii* abrigando o mesmo plasmídeo. Este efeito pode ser explicado pelo carbono extra no sistema e também o poder de redução adicional gerado a partir da oxidação de CO pela de-hidrogenase de monóxido de carbono

(CODH).

Conversão de Butiril-CoA em Butirato e Butanol:

O plasmídeo de expressão contém apenas os genes necessários para a produção de butiril-CoA a partir de acetil-CoA. Butiril-CoA pode, então, ser convertido diretamente em butanol mediante a ação de uma de-  
 5 hidrogenase de butiraldeído e de-hidrogenase de butanol (Fig. 1). Uma segunda possibilidade é que butiril-CoA seja convertido em butirato via uma fosfotransbutirilase e quinase de butirato (fig. 1), caso no qual ATP é obtido via fosforilação a nível de substrato (Substrate Level Phosphorylation - SLP).  
 10 Uma vez que operação da via de Wood-Ljungdahl requer ATP, células acetogênicas dependem de ATP a partir de SLP, o qual também se reflete no fato de que todas as bactérias acetogênicas conhecidas produzem acetato (Drake *et al.*, 2006). No entanto, a célula recombinante pode agora também gerar ATP via SLP também por meio da produção de butirato. Butirato pode,  
 15 então, ser adicionalmente reduzido em butiraldeído via uma óxido-redutase de aldeído:ferredoxina (RPA) (Fig. 1). Esta reação pode ser disparada pela ferredoxina reduzida, fornecida pela oxidação de CO via a de-hidrogenase de monóxido de carbono ( $\text{CO} + \text{Fd}_{\text{red}} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{Fd}_{\text{ox}}$ ), a etapa inicial na via de Wood-Ljungdahl. Butiraldeído pode, então, ser convertido em butanol via  
 20 uma de-hidrogenase de butanol (Fig. 1). Conversão de butirato adicionado externamente em butanol por uma cultura de *C. autoethanogenum* foi demonstrada (documento WO2009/113878).

Respectivos genes/enzimas com atividade de de-hidrogenase de butiraldeído, de-hidrogenase de butanol, fosfotransbutirilase, quinase de bu-  
 25 tirato e óxido-redutase de aldeído:ferredoxina foram identificados pelos inventores em *C. autoethanogenum*, *C. ljungdahlii* e *C. ragsdalei* (Tab. 7-10). Potenciais genes e enzimas foram previstos por meio de comparação com genes e enzimas caracterizados usando os bancos de dados BLAST (Altschul *et al.*, 1990), COG (Tatusov *et al.*, 2003) e TIGRFAM (Haft *et al.*, 2002).  
 30 Varreduras de motivo foram realizadas contra os bancos de dados PROSITE (Hulo *et al.*, 2008) e Pfam (Finn *et al.*, 2010). Genomas de *C. autoethanogenum*, *C. ljungdahlii* e *C. ragsdalei* contêm vários genes que codificam enzi-

mas com atividade de de-hidrogenase de álcool e aldeído. Conforme indicado nas Tabelas 7 a 10, descobriu-se que alguns dos quais têm uma alta homologia de mais de 70% com de-hidrogenases de butiraldeído e butanol caracterizadas de *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii* ou *C. saccharobutylicum*, enquanto que outros têm pelo menos cerca de 40% de identidade com estas enzimas. Todos os três genomas codificam exatamente uma enzima com atividade de acetil/butirial transferase de fosfato e uma com atividade de quinase de acetato/butirato. *C. autoethanogenum*, *C. ljungdahlii* e *C. ragsdalei* possuem, cada um, 2 genes de óxido-redutase de aldeído:ferredoxina.

10 Tabela 7: Genes de *C. autoethanogenum* que Conferem Potencialmente Atividade de De-hidrogenase de Butiraldeído e Butanol

Sequência	Descrição	Identidade (proteína) com enzimas caracterizadas
Seq. ID 39-40	De-hidrogenase de butanol/ butiraldeído bifuncional	<ul style="list-style-type: none"> <li>de-hidrogenase de aldeído/álcool bifuncional AdhE2 de <i>C. beijerinckii</i> NCIMB 8052 (Identidades = 644/861 (75%), Positivas = 748/861 (87%), e-valor = 0,0)</li> <li>de-hidrogenase de aldeído/álcool bifuncional AdhE2 de <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 (Identidades = 594/858 (70%), Positivas = 730/858 (86%), e-valor = 0,0)</li> </ul>
Seq. ID 41-42	De-hidrogenase de butiraldeído	<ul style="list-style-type: none"> <li>de-hidrogenase de aldeído/álcool bifuncional AdhE2 de <i>C. beijerinckii</i> NCIMB 8052 (Identidades = 367/504 (73%), Positivas = 437/504 (87%), e-valor = 0,0)</li> <li>de-hidrogenase de aldeído/álcool bifuncional AdhE2 de <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 (354/504 (71%), Positivas = 440/504 (88%), e-valor = 0,0)</li> </ul>

Sequência	Descrição	Identidade (proteína) com enzimas caracterizadas
Seq. ID 43-44	De-hidrogenase de butiraldeído	<ul style="list-style-type: none"> <li>• de-hidrogenase de aldeído/álcool bifuncional AdhE2 de <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 (Identidades = 173/352 (50%), Positivas = 236/352 (68%), e-valor = 1e-91)</li> <li>• de-hidrogenase de aldeído/álcool bifuncional AdhE2 de <i>C. beijerinckii</i> NCIMB 8052 (Identidades = 160/374 (43%), Positivas = 234/374 (63%), e-valor = 5e-87)</li> <li>• de-hidrogenase de aldeído/álcool bifuncional AdhE1 de <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 (Identidades = 158/366 (44%), Positivas = 235/366 (65%), e-valor = 5e-82)</li> <li>• de-hidrogenase de butiraldeído Ald de <i>C. beijerinckii</i> NCIMB8052 (Identidades = 110/354 (32%), Positivas = 184/354 (52%), e-valor = 9e-44)</li> <li>• de-hidrogenase de butiraldeído de <i>C. saccharoperbutylacetonicum</i> (111/354 (32%), Positivas = 182/354 (52%), e-valor = 2e-44)</li> </ul>
Seq. ID 45-46	De-hidrogenase de butiraldeído	<ul style="list-style-type: none"> <li>• de-hidrogenase de aldeído/álcool bifuncional AdhE2 de <i>C. beijerinckii</i> NCIMB 8052 (Identidades = 188/477 (40%), Positivas = 270/477 (57%), e-valor = 9e-84)</li> <li>• de-hidrogenase de aldeído/álcool bifuncional AdhE2 de <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 (Identidades = 164/428 (39%), Positivas = 256/428 (60%), e-valor = 1e-79)</li> </ul>
Seq. ID 119-120	De-hidrogenase de butanol	<ul style="list-style-type: none"> <li>• de-hidrogenase de butanol dependente de NADPH de <i>C. saccharobutylicum</i> (Identidades = 285/388 (74%), Positivas = 334/388 (87%), e-valor = 7e-177)</li> <li>• de-hidrogenase de aldeído/álcool bifuncional AdhE2 de <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 (Identidades = 163/396 (42%), Positivas = 237/396 (60%), e-valor = 4e-80)</li> </ul>

Sequência	Descrição	Identidade (proteína) com enzimas caracterizadas
Seq. ID 121-122	De-hidrogenase de butanol	<ul style="list-style-type: none"> <li>de-hidrogenase de butanol dependente de NADPH de <i>C. saccharobutylicum</i> (Identidades = 271/388 (70%), Positivas = 328/388 (85%), e-valor = 3e-168)</li> <li>de-hidrogenase de aldeído/álcool bifuncional AdhE2 de <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 (Identidades = 169/403 (42%), Positivas = 240/403 (60%), e-valor = 3e-83)</li> </ul>
Seq. ID 51-52	De-hidrogenase de butanol	<ul style="list-style-type: none"> <li>de-hidrogenase de aldeído/álcool bifuncional AdhE2 de <i>C. beijerinckii</i> NCIMB 8052 (246/315 (79%), Positivas = 287/315 (92%), e-valor = 1e-153)</li> <li>de-hidrogenase de aldeído/álcool bifuncional AdhE2 de <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 (208/312 (67%), Positivas = 260/312 (84%), e-valor = 4e-128)</li> </ul>
Seq. ID 53-54	De-hidrogenase de butanol	<ul style="list-style-type: none"> <li>de-hidrogenase de butanol dependente de NADPH de <i>C. saccharobutylicum</i> (Identidades = 264/388 (69%), Positivas = 326/388 (85%), e-valor = 5e-163)</li> <li>de-hidrogenase de aldeído/álcool bifuncional AdhE2 de <i>C. beijerinckii</i> NCIMB8052 (Identidades = 169/410 (42%), Positivas = 246/410 (60%), e-valor = 5e-82)</li> <li>de-hidrogenase de aldeído/álcool bifuncional AdhE2 de <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 (Identidades = 162/402 (41%), Positivas = 240/402 (60%), e-valor = 2e-78)</li> </ul>
Seq. ID 55-56	De-hidrogenase de butanol	<ul style="list-style-type: none"> <li>de-hidrogenase de butanol dependente de NADH BdhA de <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 (Identidades = 161/388 (42%), Positivas = 243/388 (63%), e-valor = 7e-92)</li> <li>de-hidrogenase de butanol dependente de NADH BdhB de <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 (Identidades = 155/389 (40%), Positivas = 242/389 (63%), e-valor = 4e-85)</li> </ul>

Sequência	Descrição	Identidade (proteína) com enzimas caracterizadas
Seq. ID 57-58	De-hidrogenase de butanol	<ul style="list-style-type: none"> <li>NADPH-dependet de-hidrogenase de butanol AdhE2 de <i>C. saccharobutylicum</i> (Identidades = 156/385 (41%), Positivas = 236/385 (62%), e-valor = 1e-72)</li> <li>de-hidrogenase de aldeído/álcool bifuncional AdhE2 de <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 (Identidades = 154/412 (38%), Positivas = 233/412 (57%), e-valor = 8e-70)</li> </ul>
Seq. ID 59-60	acetil/butiril transferase de fosfato	<ul style="list-style-type: none"> <li>butiril transferase de fosfato de <i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 (Identidades = 85/338 (26%), Positivas = 146/338 (44%), e-valor = 2e-12)</li> </ul>
Seq ID 61-62	quinase de acetato/butirato	<ul style="list-style-type: none"> <li>quinase de butirato de <i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 (Identidades = 49/175 (28%), Positivas = 78/175 (45%), e-valor 5e-08)</li> </ul>
Seq ID 63-64	óxido-redutase de aldeído:ferredoxina	<ul style="list-style-type: none"> <li>óxido-redutase de aldeído:ferredoxina de <i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 (Identidades = 183/618 (30%), Positivas = 311/618 (51%), e-valor = 6e-72)</li> </ul>
Seq ID 65-66	óxido-redutase de aldeído:ferredoxina	<ul style="list-style-type: none"> <li>óxido-redutase de aldeído:ferredoxina de <i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 (Identidades = 191/633 (31%), Positivas = 308/633 (49%), e-valor = 2e-70)</li> </ul>

**Tabela 8: Genes de *C. ljungdahlii* que Conferem Potencialmente Atividade de De-hidrogenase de Butiraldeído e Butanol**

Sequência	Descrição	Identidade com enzimas caracterizadas
Seq. ID 67-68	de-hidrogenase de butiraldeído/butanol bifuncional	<ul style="list-style-type: none"> <li>de-hidrogenase de aldeído/álcool bifuncional AdhE2 de <i>C. beijerinckii</i> NCIMB 8052 (Identidades = 644/862 (75%), Positivas = 751/862 (88%), e-valor = 0,0)</li> <li>de-hidrogenase de aldeído/álcool bifuncional AdhE2 de <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 (Identidades = 592/858 (69%), Positivas = 729/858 (85%), e-valor = 0,0)</li> </ul>

Sequência	Descrição	Identidade com enzimas caracterizadas
Seq. ID 69-70	de-hidrogenase de butiraldeído/butanol bifuncional	<ul style="list-style-type: none"> <li>• de-hidrogenase de aldeído/álcool bifuncional AdhE2 de <i>C. beijerinckii</i> NCIMB 8052 (Identities = 636/860 (74%), Positivas = 752/860 (88%), e-valor = 0,0)</li> <li>• de-hidrogenase de aldeído/álcool bifuncional AdhE2 de <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 (Identities = 585/858 (69%), Positivas = 733/858 (86%), e-valor = 0,0)</li> </ul>
Seq. ID 71-72	De-hidrogenase de butiraldeído	<ul style="list-style-type: none"> <li>• de-hidrogenase de aldeído/álcool bifuncional AdhE2 de <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 (Identities = 209/429 (49%), Positivas = 286/429 (67%), e-valor = 4e-111)</li> <li>• de-hidrogenase de aldeído/álcool bifuncional AdhE2 de <i>C. beijerinckii</i> NCIMB 8052 (Identities = 196/467 (42%), Positivas = 286/467 (62%), e-valor = 1e-102)</li> <li>• de-hidrogenase de aldeído/álcool bifuncional AdhE1 de <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 (Identities = 193/443 (44%), Positivas = 283/443 (64%), e-valor = 7e-100)</li> <li>• de-hidrogenase de butiraldeído Ald de <i>C. beijerinckii</i> NCIMB8052 (Identities = 125/409 (31%), Positivas = 206/409 (51%), e-valor = 3e-49)</li> <li>• de-hidrogenase de butiraldeído de <i>C. saccharoperbutylacetonicum</i> (124/409 (31%), Positivas = 204/409 (50%), e-valor = 2e-48)</li> </ul>
Seq. ID 73-74	De-hidrogenase de butiraldeído	<ul style="list-style-type: none"> <li>• de-hidrogenase de aldeído/álcool bifuncional AdhE2 de <i>C. beijerinckii</i> NCIMB 8052 (Identities = 188/477 (40%), Positivas = 270/477 (57%), e-valor = 9e-84)</li> <li>• de-hidrogenase de aldeído/álcool bifuncional AdhE2 de <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 (Identities = 164/428 (39%), Positivas = 256/428 (60%), e-valor = 1e-79)</li> </ul>



Sequência	Descrição	Identidade com enzimas caracterizadas
Seq. ID 75-76	De-hidrogenase de butanol	<ul style="list-style-type: none"> <li>de-hidrogenase de butanol dependente de NADPH de <i>C. saccharobutylicum</i> (Identities = 285/388 (74%), Positivas = 335/388 (87%), e-valor = 9e-177)</li> <li>de-hidrogenase de aldeído/álcool bifuncional AdhE2 de <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 (Identities = 164/396 (42%), Positivas = 238/396 (61%), e-valor = 1e-80)</li> </ul>
Seq. ID 77-78	De-hidrogenase de butanol	<ul style="list-style-type: none"> <li>de-hidrogenase de butanol dependente de NADPH de <i>C. saccharobutylicum</i> (Identities = 281/388 (73%), Positivas = 327/388 (85%), e-valor = 2e-173)</li> <li>de-hidrogenase de aldeído/álcool bifuncional AdhE2 de <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 (Identities = 169/403 (42%), Positivas = 240/403 (60%), e-valor = 3e-83)</li> </ul>
Seq. ID 79-80	De-hidrogenase de butanol	<ul style="list-style-type: none"> <li>de-hidrogenase de butanol dependente de NADPH de <i>C. saccharobutylicum</i> (Identities = 264/388 (69%), Positivas = 326/388 (85%), e-valor = 5e-163)</li> <li>de-hidrogenase de aldeído/álcool bifuncional AdhE2 de <i>C. beijerinckii</i> NCIMB8052 (Identities = 169/410 (42%), Positivas = 246/410 (60%), e-valor = 4e-82)</li> <li>de-hidrogenase de aldeído/álcool bifuncional AdhE2 de <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 (Identities = 162/402 (41%), Positivas = 240/402 (60%), e-valor = 2e-78)</li> </ul>
Seq. ID 81-82	De-hidrogenase de butanol	<ul style="list-style-type: none"> <li>de-hidrogenase de butanol dependente de NADH BdhA de <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 (Identities = 161/388 (42%), Positivas = 243/388 (63%), e-valor = 7e-92)</li> <li>de-hidrogenase de butanol dependente de NADH BdhB de <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 (Identities = 155/389 (40%), Positivas = 242/389 (63%), e-valor = 4e-85)</li> </ul>

Sequência	Descrição	Identidade com enzimas caracterizadas
Seq. ID 83-84	De-hidrogenase de butanol	<ul style="list-style-type: none"> <li>de-hidrogenase de butanol dependente de NADPH de <i>C. saccharobutylicum</i> (Identities = 150/389 (39%), Positivas = 233/389 (60%), e-valor = 7e-73)</li> <li>de-hidrogenase de aldeído/álcool bifuncional AdhE2 de <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 (Identities = 154/412 (38%), Positivas = 233/412 (57%), e-valor = 8e-70)</li> </ul>
Seq. ID 85-86	acetil/butiril transferase de fosfato	<ul style="list-style-type: none"> <li>butiril transferase de fosfato de <i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 (91/340 (27%), Positivas = 156/340 (46%), e-valor = 1e-16)</li> </ul>
Seq ID 87-88	quinase de acetato/butirato	<ul style="list-style-type: none"> <li>quinase de butirato de <i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 (49/162 (31%), Positivas = 77/162 (48%), e-valor 5e-08)</li> </ul>
Seq ID 89-90	óxido-redutase de aldeído:ferredoxina	<ul style="list-style-type: none"> <li>óxido-redutase de aldeído:ferredoxina de <i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 (188/631 (30%), Positivas = 318/631 (51%), e-valor = 3e-11)</li> </ul>
Seq ID 91-92	óxido-redutase de aldeído:ferredoxina	<ul style="list-style-type: none"> <li>óxido-redutase de aldeído:ferredoxina de <i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 (Identities = 191/633 (31%), Positivas = 308/633 (49%), e-valor = 2e-70)</li> </ul>

**Tabela 9: Genes de *C. ragsdalei* que Conferem Potencialmente Atividade de De-hidrogenase de Butiraldeído e Butanol**

Sequência	Descrição	Identidade com enzimas caracterizadas
Seq. ID 93-94	de-hidrogenase de butiraldeído/butanol bifuncional	<ul style="list-style-type: none"> <li>de-hidrogenase de aldeído/álcool bifuncional AdhE2 de <i>C. beijerinckii</i> NCIMB 8052 (Identities = 645/861 (75%), Positivas = 751/861 (88%), e-valor = 0,0)</li> <li>de-hidrogenase de aldeído/álcool bifuncional AdhE2 de <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 (Identities = 591/858 (69%), Positivas = 731/858 (86%), e-valor = 0,0)</li> </ul>

Sequência	Descrição	Identidade com enzimas caracterizadas
Seq. ID 95-96	de-hidrogenase de butiraldeído/butanol bifuncional	<ul style="list-style-type: none"> <li>• de-hidrogenase de aldeído/álcool bifuncional AdhE2 de <i>C. beijerinckii</i> NCIMB 8052 (Identities = 639/860 (75%), Positivas = 752/860 (88%), e-valor = 0,0)</li> <li>• de-hidrogenase de aldeído/álcool bifuncional AdhE2 de <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 (Identities = 591/858 (69%), Positivas = 735/858 (86%), e-valor = 0,0)</li> </ul>
Seq. ID 97-98	De-hidrogenase de butiraldeído	<ul style="list-style-type: none"> <li>• de-hidrogenase de aldeído/álcool bifuncional AdhE2 de <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 (Identities = 214/457 (47%), Positivas = 294/457 (65%), e-valor = 5e-111)</li> <li>• de-hidrogenase de aldeído/álcool bifuncional AdhE2 de <i>C. beijerinckii</i> NCIMB 8052 (Identities = 200/457 (44%), Positivas = 283/457 (62%), e-valor = 1e-103)</li> <li>• de-hidrogenase de aldeído/álcool bifuncional AdhE1 de <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 (Identities = 198/457 (44%), Positivas = 289/457 (64%), e-valor = 4e-101)</li> <li>• de-hidrogenase de butiraldeído Ald de <i>C. beijerinckii</i> NCIMB8052 (Identities = 125/409 (31%), Positivas = 206/409 (51%), e-valor = 3e-49)</li> <li>• de-hidrogenase de butiraldeído de <i>C. saccharoperbutylacetonicum</i> (Identities = 123/409 (31%), Positivas = 205/409 (51%), e-valor = 1e-48)</li> </ul>
Seq. ID 99-100	De-hidrogenase de butiraldeído	<ul style="list-style-type: none"> <li>• de-hidrogenase de aldeído/álcool bifuncional AdhE2 de <i>C. beijerinckii</i> NCIMB 8052 (Identities = 188/477 (40%), Positivas = 270/477 (57%), e-valor = 9e-84)</li> <li>• de-hidrogenase de aldeído/álcool bifuncional AdhE2 de <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 (Identities = 164/428 (39%), Positivas = 256/428 (60%), e-valor = 1e-79)</li> </ul>

Sequência	Descrição	Identidade com enzimas caracterizadas
Seq. ID 101-102	De-hidrogenase de butanol	<ul style="list-style-type: none"> <li>de-hidrogenase de butanol dependente de NADPH de <i>C. saccharobutylicum</i> (Identities = 285/388 (74%), Positivas = 335/388 (87%), e-valor = 9e-177)</li> <li>de-hidrogenase de aldeído/álcool bifuncional AdhE2 de <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 (Identities = 164/396 (42%), Positivas = 238/396 (61%), e-valor = 1e-80)</li> </ul>
Seq. ID 103-104	De-hidrogenase de butanol	<ul style="list-style-type: none"> <li>de-hidrogenase de butanol dependente de NADPH de <i>C. saccharobutylicum</i> (Identities = 281/388 (73%), Positivas = 327/388 (85%), e-valor = 2e-173)</li> <li>de-hidrogenase de aldeído/álcool bifuncional AdhE2 de <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 (Identities = 169/403 (42%), Positivas = 240/403 (60%), e-valor = 3e-83)</li> </ul>
Seq. ID 105-106	De-hidrogenase de butanol	<ul style="list-style-type: none"> <li>de-hidrogenase de butanol dependente de NADPH de <i>C. saccharobutylicum</i> (Identities = 264/388 (69%), Positivas = 326/388 (85%), e-valor = 5e-163)</li> <li>de-hidrogenase de aldeído/álcool bifuncional AdhE2 de <i>C. beijerinckii</i> NCIMB8052 (Identities = 169/410 (42%), Positivas = 246/410 (60%), e-valor = 4e-82)</li> <li>de-hidrogenase de aldeído/álcool bifuncional AdhE2 de <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 (Identities = 162/402 (41%), Positivas = 240/402 (60%), e-valor = 2e-78)</li> </ul>
Seq. ID 107-108	De-hidrogenase de butanol	<ul style="list-style-type: none"> <li>de-hidrogenase de butanol dependente de NADH BdhA de <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 (Identities = 162/388 (42%), Positivas = 243/388 (63%), e-valor = 3e-92)</li> <li>de-hidrogenase de butanol dependente de NADH BdhB de <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 (Identities = 155/389 (40%), Positivas = 242/389 (63%), e-valor = 6e-85)</li> </ul>

Sequência	Descrição	Identidade com enzimas caracterizadas
Seq. ID 109-110	De-hidrogenase de butanol	<ul style="list-style-type: none"> <li>de-hidrogenase de butanol dependente de NADPH de <i>C. saccharobutylicum</i> (Identities = 147/389 (38%), Positivas = 227/389 (59%), e-valor = 3e-71)</li> <li>de-hidrogenase de aldeído/álcool bifuncional AdhE2 de <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 (Identities = 155/412 (38%), Positivas = 233/412 (57%), e-valor = 2e-70)</li> </ul>
Seq. ID 111-112	acetil/butiril transferase de fosfato	<ul style="list-style-type: none"> <li>butiril transferase de fosfato de <i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 87/325 (27%), Positivas = 148/325 (46%), e-valor = 2e-16)</li> </ul>
Seq ID 113-114	quinase de acetato/butirato	<ul style="list-style-type: none"> <li>quinase de butirato de <i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 (Identities = 49/162 (31%), Positivas = 77/162 (48%), e-valor 4e-11)</li> </ul>
Seq ID 115-116	óxido-redutase de aldeído:ferredoxina	<ul style="list-style-type: none"> <li>óxido-redutase de aldeído:ferredoxina de <i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 (Identities = 187/633 (30%), Positivas = 319/633 (51%), e-valor = 3e-74)</li> </ul>
Seq ID 117-118	óxido-redutase de aldeído:ferredoxina	<ul style="list-style-type: none"> <li>óxido-redutase de aldeído:ferredoxina de <i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 (Identities = 187/633 (30%), Positivas = 302/633 (48%), e-valor = 1e-69)</li> </ul>

#### Estudos de Expressão Gênica

Estudos de expressão gênica foram realizados para confirmar a expressão bem-sucedida dos genes introduzidos de tiolase, de-hidrogenase de 3-hidroxibutiril-CoA, Crotonase, de-hidrogenase de butiril-CoA, Flavoproteína A de Transferência de Elétrons e Flavoproteína B de Transferência Eletrônica em *C. autoethanogenum* abrigando o plasmídeo de butanol pM-TL85245-thIA-crt-hbd. Além disso, descobriu-se que uma seleção de genes putativos de de-hidrogenase de butiraldeído, de-hidrogenase de butanol, acetil/butiril transferase de fosfato, quinase de acetato/butirato, óxido-redutase de aldeído:ferredoxina identificados no genoma de *C. autoethanogenum* (Tabela 7) também eram expresso sob condições de fermentação padrões ( Figura 60).

Uma amostra foi coletada por meio de centrifugação (6000 x g, 5

min, 4 °C). O RNA foi isolado através de suspensão do sedimento celular em 100 µL de solução de lisozima (50.000 U de lisozima, SDS a 10%, Tris-HCl a 10 mM, EDTA a 0,1 mM, pH de 8). Após 5 min, 350 mL de tampão de lise (contendo 10 µl de 2-mercaptoetanol) foram adicionados. A suspensão de

5 células foi mecanicamente rompida por meio de passagem cinco vezes através de uma agulha de calibre 18-21. O RNA foi, então, isolado usando o kit PureLink™ RNA Mini (Invitrogen) e eluído em 100 µL de água sem RNase. O RNA foi verificado via PCR e eletroforese em gel e quantificado espectrofotometricamente e tratado com DNase I (Roche), se necessário. A qualidade e integridade do RNA foram verificadas usando um Bioanalyzer (Agilent

10 Technologies). A etapa de transcrição reversa foi realizada usando o kit SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen). As reações de RT-PCR foram realizadas no MyiQ Single Colour Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories) em um volume de reação de 15 µl com 25 ng de modelo de cDNA, 67 nM de cada um dos iniciadores (Tab. 11) e 1x iQ SYBR

15 Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA 94547, EUA). Quinase de guanilato e ligase de tetraidrofolato de formato foram usadas como gene de limpeza e controles não-modelo foram incluídos. As condições de reação foram 95 °C durante 3 min, seguido por 40 ciclos de 95 °C durante 15 s, 55

20 °C durante 15 s e 72 °C durante 30 s. Uma análise de curva de fusão foi realizada imediatamente após término de RT-PCR (38 ciclos de 58 °C a 95 °C a 1 °C/s) para detecção de dimerização de iniciador ou outros defeitos de amplificação.

mRNA para todos os genes heterólogos podem ser detectados

25 com sucesso, mostrando que os genes são expressos. O sinal para todos os genes estava em um nível similar.

Tabela 10: Oligonucleotídeos para qRT-PCR

Alvo	Nome do oligonucleotídeo	Sequência de DNA (5' para 3')	SEQ ID NO
Quinase de guanilato	GnK-F	TCAGGACCTTCTGGA- ACTGG	131
	GnK-R	ACCTCCCCTTTTCTTGAGAGA	132
Ligase de tetraidrofolato de formato	FoT4L-F	CAGGTTTCGGTGCTGACC- TA	133
	FoT4L-R	AACTCCGCCGTTGTATTTCA	134
Tiolase	thIA-RT-F	TTGATGAAATGATCACT- GACGGATT	123
	thIA-RT-R	GAAATGTTCCATCTCT- CAGCTATGT	124
3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	hdb-RT-F	CATCACTTTCAATAACAGA- AGTGCC	125
	hbd-RT-R	TACCTCTACAAGCTTCATA- ACAGGA	126
Dehidrogenase de butiril-CoA	bcd-RT-F	AAAATGGGTCAGTATGG- TATGATGG	127
	bcd-RT-R	TGTAGTACCGCAAACCTTT- GATAAT	128
Flavoproteína A de Transferência de Elétrons	etfA-RT-F	CAAGTTTACTTGGTGGAA- CAATAGC	129
	etfA-RT-R	GAGTTGGTCTTACAGTTT- TACCAGT	130
dehidrogenase de butiraldeído/butanol bifuncional (Seq. ID 39)	adhE-RT-F	CGGCTGCTCAAAGAA- ATTTTCTAGC	137
	adhE-RT-R	CCAGAACTCCG- CAGGTCTTTTCACCC	138
Dehidrogenase de butiraldeído (Seq. ID 41)	Bld1-RT-F	GGCAGTAGAAGAAAGCG- GAATGG	139
	Bld1-RT-R	AAAGCCTGCATCTCTCTC- TAAACTCC	140
Dehidrogenase de butiraldeído (Seq. ID 45)	Bld2-RT-F	TAATGATTTGCTCTCCATC- CAAGAATCC	141
	Bld2-RT-R	TCCGATTTCTTCCGCCA- TACG	142
Dehidrogenase de butanol (Seq. ID 53)	BDH1-RT-F	AGCTGTAGTAGTTGTTG- GAGGAGGATCC	143
	BDH1-RT-R	CACAGACGGATCTGGTT- CAACACC	144

Alvo	Nome do oligonucleotídeo	Sequência de DNA (5' para 3')	SEQ_ID NO.
De-hidrogenase de butanol (Seq. ID 57)	BDH2-RT-F	GAATCTATTCAACTTTTA-GAGCAAGTCACTGG	145
	BDH2-RT-R	CAACGGAAGTTATTC-CAGCTTTGC	146
acetil/butiril transferase de fosfato (Seq. ID 59)	Pta-RT-F	GATGCTTTTTATGAATTGA-GAAAGAAGAAGG	147
	Pta-RT-R	TGAAACCAATCCATCTG-CATCTCC	148
quinase de aceto/butirato (Seq. ID 61)	Ack-RT-F	TGCAAGATGAAAGTGTTG-TAGCAAAGG	149
	Ack-RT-R	ACTTTGTGGTCTTC-CATTGGTTGC	150
óxido-redutase de aldeído:ferredoxina (Seq. ID 63)	AOR1-RT-F	CTTCAACAGGAAACA-GATTCGAGAGC	151
	AOR1-RT-R	CCAACACCAC-CACGTCCTGC	152
óxido-redutase de aldeído:ferredoxina (Seq. ID 65)	AOR2-RT-F	GGTTGGGATATGATAATAG-TAGAGGATAAGGC	153
	AOR2-RT-R	GTAACTTTTCCCAA-AGCTGTGACG	154

A invenção foi aqui descrita com referência à determinadas modalidades preferidas para permitir que o leitor pratique a invenção sem experimentação indevida. No entanto, uma pessoa com conhecimentos correntes na técnica reconhecerá facilmente que muitos dos componentes e parâmetros podem ser alterados ou modificados ou substituídos por equivalentes conhecidos até certo ponto sem nos afastarmos do escopo da invenção. Deverá ser notado que tais modificações e equivalentes são aqui incorporados como se individualmente apresentados. Os títulos, cabeçalhos ou similares são fornecidos para melhorar a compreensão do presente documento pelo leitor e não devem ser lidos como limitativos do âmbito da presente invenção.

As descrições completas de todos os Pedidos, Patentes e Publicações citados acima e abaixo, se houver, são aqui incorporadas por referência. No entanto, a referência a quaisquer Pedidos, Patentes e Publicações no presente relatório descritivo não é e não deve ser tomada como um reconhecimento ou qualquer outra forma de sugestão de que eles constitu-



em a técnica válida anterior ou parte do conhecimento geral comum em qualquer país do mundo.

- 5 Por todo o presente relatório descritivo e nas reivindicações que seguem, a menos que o contexto exija de outra forma, as palavras "compreende", "compreendendo" e similares devem ser entendidas em um sentido inclusivo, em oposição a um sentido exclusivo, isto é, no sentido de "incluindo, porém sem limitações".

## REIVINDICAÇÕES

1. Micro-organismo recombinante que produz 1-butanol, caracterizado pelo fato de que o micro-organismo compreende tiolase exógena, de-hidrogenase de 3-hidroxi-butiril-CoA exógena, crotonase/hidratase de crotonil-CoA exógena, de-hidrogenase de butiril-CoA exógena e Flavoproteína A e B de Transporte de Elétrons exógenas, em que a tiolase exógena, de-hidrogenase de 3-hidroxi-butiril-CoA exógena, crotonase/hidratase de crotonil-CoA exógena, de-hidrogenase de butiril-CoA exógena, e Flavoproteína A e B de Transporte de Elétrons exógenas são introduzidas por transformação, e em que o micro-organismo recombinante é derivado de uma micro-organismo parental selecionado do grupo consistindo em *Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium coskatii* e *Clostridium ragsdalei*.

2. Micro-organismo recombinante de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o micro-organismo compreende ainda um ou mais ácido nucleicos exógenos codificando uma ou mais enzimas selecionadas a partir de de-hidrogenase de butiraldeído, de-hidrogenase de butanol e uma de-hidrogenase de butiraldeído/de-hidrogenase de butanol bifuncional.

3. Micro-organismo recombinante de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o micro-organismo compreende ainda um ou mais ácido nucleicos exógenos codificando uma ou mais enzimas selecionadas a partir de fosfotransbutirilase, quinase de butirato, óxido-redutase de aldeído dependente de ferredoxina e de-hidrogenase de butanol.

4. Micro-organismo recombinante de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de ser depositado na DSMZ sob o número de acesso DSM24138.

5. Método para a produção de 1-butanol, caracterizado pelo fato de ser por meio de fermentação microbiana de um substrato gasoso compreendendo CO, compreendendo adicionar ao substrato o micro-organismo recombinante como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4.

6. Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo

fato de que o rendimento de 1-butanol é de pelo menos de 0,075 gramas por litro de caldo de fermentação (g/l).

7. Método de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o rendimento de 1-butanol é de 0,075 g/l a 20 g/l.

5 8. Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o substrato gasoso compreende pelo menos 20% a 100% de CO em volume.

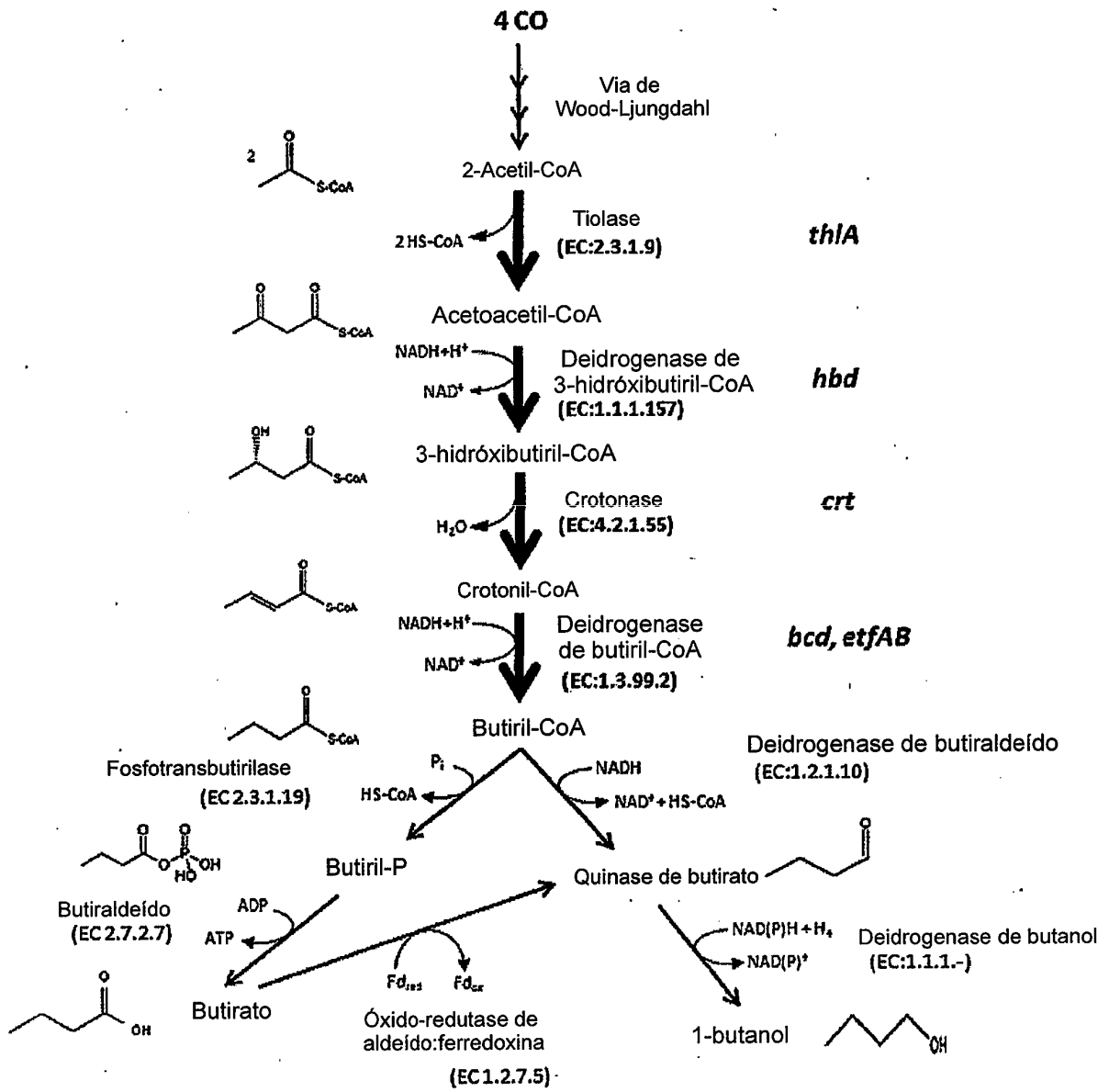


FIG. 1

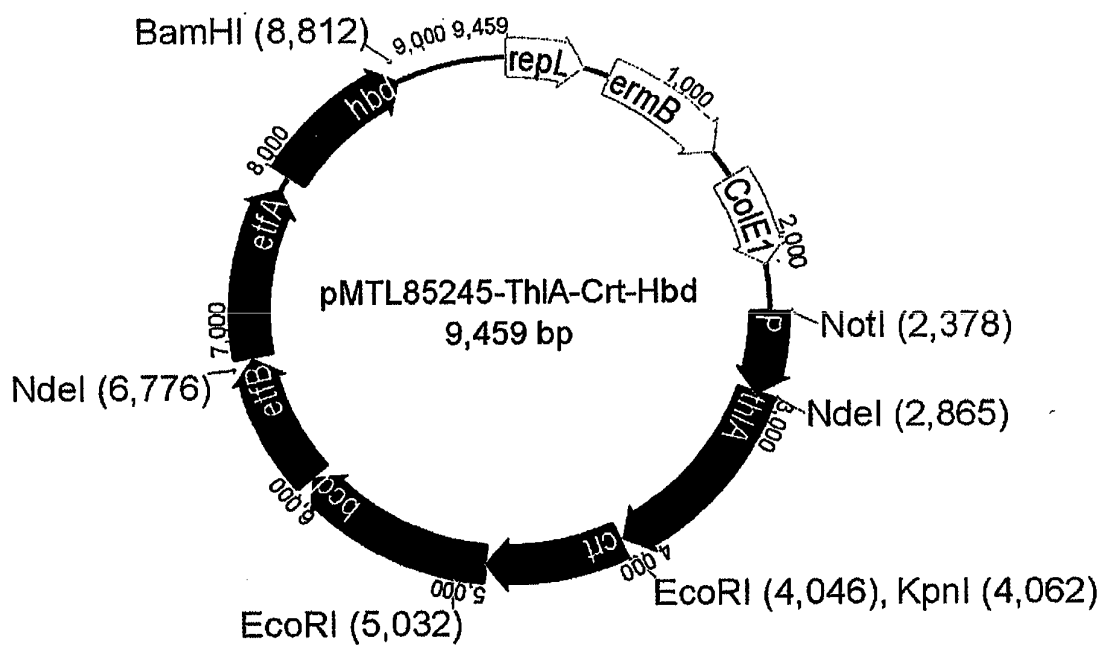
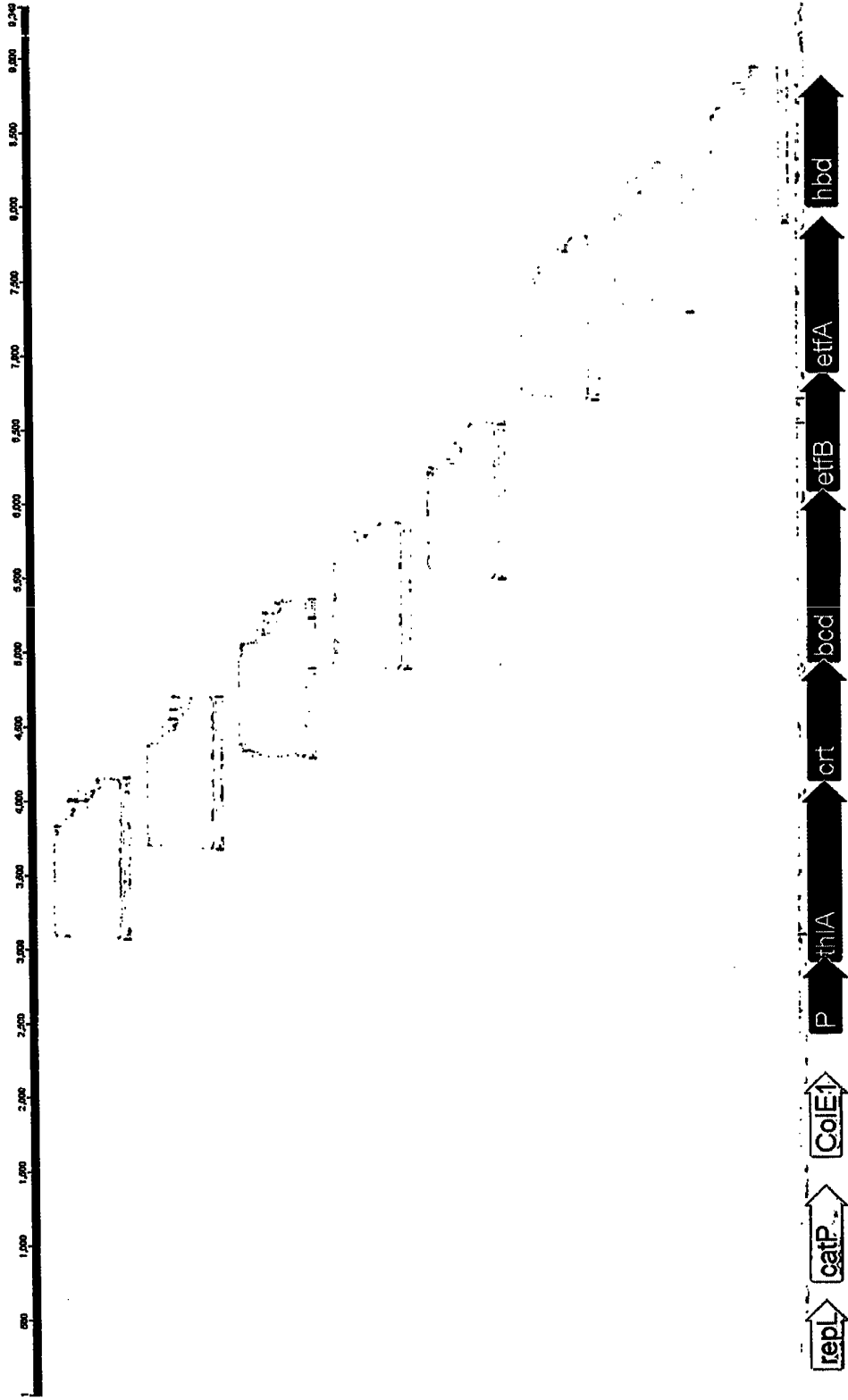


FIG. 2

FIG. 3



	1	10	20	30																															
CAU																																			
CLJ																																			
CRA	A	T	G	T	T	T	C	C	C	T	S	T	A	A	T	G	C	A	T	A	T	A	T	T	C	A	G	C	A	C					
DMT	A	T	G	T	T	T	C	C	G	T	G	C	A	A	T	G	C	C	T	A	T	A	T	C	G	A	A	T	A	T					
		40	50	60																															
CAU																																			
CLJ			A	T	G	A	A	C	A	G	T	T	T	T	A	T	T	G	A	A															
CRA	G	G	A	G	A	T	A	G	G	A	A	T	A	T	G	A	A	T	A	A	T	T	T	T	A	T	T	G	A	A					
DMT	G	G	T	G	A	T	A	A	A	A	A	T	A	T	G	A	A	C	A	G	C	T	T	T	A	T	C	G	A	A					
		70	80	90																															
CAU																																			
CLJ	G	A	T	G	T	T	G	A	A	C	A	A	A	T	T	T	A	C	A	A	T	T	T	T	A	T	T	A	A	A					
CRA	G	A	T	A	T	T	G	A	A	G	A	A	A	T	T	T	A	T	A	A	T	T	T	T	A	T	T	A	A	A	A				
DMT	G	A	T	G	T	G	G	A	A	C	A	G	A	T	C	T	A	C	A	A	C	T	T	C	A	T	T	A	A	A	A				
		100	110	120																															
CAU				A	T	G	C	A	T																										
CLJ	A	A	A	A	T	A	T	A	G	A	T	G	T	A	G	A	A	G	A	G	A	A	G	A	T	G	C	A	T						
CRA	A	A	A	A	T	A	C	A	G	A	T	G	T	A	G	A	A	G	A	A	T	A	T	C	A	T									
DMT	A	A	G	A	A	C	A	T	G	A	T	G	G	A	A	G	A	A	A	G	A	T	G	C	A	T									
		130	140	150																															
CAU	T	T	T	A	T	A	G	A	A	C	T	T	A	T	A	G	C	A	A	A	T	C	T	A	A	T									
CLJ	T	T	T	A	T	A	G	A	A	C	T	T	A	T	A	A	G	C	A	A	A	A	T	C	T	A	A	T							
CRA	T	T	T	A	T	A	G	A	A	C	T	T	A	T	A	G	G	C	A	A	A	G	A	C	T	T	A	A	T						
DMT	T	T	C	A	T	T	G	A	A	A	C	T	A	T	A	A	A	C	A	G	A	A	A	G	C	A	A	C							
		160	170	180																															
CAU	A	T	G	A	A	G	A	A	A	A	A	A	A	T	T	A	G	C	T	T	T	C	A	G	A	A	G	A	A						
CLJ	A	T	G	A	A	G	A	A	A	A	A	A	A	T	T	A	G	C	T	T	T	T	C	A	G	A	A	G	A	A					
CRA	A	T	G	A	A	G	A	A	A	A	A	A	A	T	T	A	G	C	T	T	T	T	C	A	G	A	A	G	A	A					
DMT	A	T	G	A	A	G	A	A	A	A	A	A	A	G	A	T	T	A	G	C	T	T	T	A	G	C	G	A	A	A					
		190	200	210																															
CAU	T	A	C	T	A	T	A	A	A	A	C	A	G	A	A	A	A	A	A	T	T	A	T	G	A	A	T	G	G	A	A	A	A		
CLJ	T	A	C	T	A	T	A	A	A	A	C	A	G	A	A	A	A	A	A	T	T	A	T	G	A	A	T	G	G	A	A	A	A		
CRA	T	A	C	T	A	T	A	A	A	A	C	A	G	A	A	A	A	A	A	T	T	A	T	G	A	A	T	G	G	A	A	A	A		
DMT	T	A	C	T	A	T	A	A	A	A	C	A	G	A	A	A	A	A	A	G	A	T	T	A	T	G	A	A	C	G	G	C	A	A	A
		220	230	240																															
CAU	A	A	T	G	G	A	G	T	A	T	T	G	T	A	T	A	C	T	C	C	G	G	A	A	A	T	G								
CLJ	A	A	T	G	G	A	G	T	A	T	T	G	T	A	T	A	C	T	C	C	G	G	A	A	A	T	G								
CRA	A	A	T	G	G	A	G	T	A	T	T	G	T	A	T	A	C	T	C	C	G	G	A	A	A	T	G								
DMT	A	A	T	G	G	C	G	T	T	T	T	G	T	A	C	A	C	C	C	C	G	C	C	G	A	A	T	G							
		250	260	270																															
CAU	G	C	A	G	C	A	T	T	T	A	T	G	G	T	T	A	A	A	A	A	A	C	T	T	G	A	T	A	A	A	T				
CLJ	G	C	A	G	C	A	T	T	T	A	T	G	G	T	T	A	A	A	A	A	A	C	T	T	G	A	T	A	A	A	T				
CRA	G	C	A	G	C	A	T	T	T	A	T	G	G	T	T	A	A	A	A	A	A	C	T	T	G	A	T	A	A	A	T				
DMT	G	C	G	G	C	C	T	T	T	A	T	G	G	T	T	A	A	A	A	A	A	T	C	T	G	A	T	C	A	A	C				
		280	290	300																															
CAU	G	T	C	A	A	T	G	A	T	G	T	A	A	T	T	G	G	A	A	A	T	C	C	A	T	T	T	A	A	A					
CLJ	G	T	C	A	A	T	G	A	T	G	T	A	A	T	T	G	G	A	A	A	T	C	C	A	T	T	T	A	A	A					
CRA	G	T	C	A	A	T	G	A	T	G	T	A	A	T	T	G	G	A	A	A	T	C	C	A	T	T	T	A	A	A					
DMT	G	T	T	A	A	C	G	A	T	G	T	T	A	T	T	G	G	C	A	A	T	C	C	G	T	T	T	A	T	T					

FIG. 4a

	310	320	330
CAU	A A A A T A A T A G A T C C T T C C T G T G G A T C T G G G		
CLJ	A A A A T A A T A G A T C C T T C C T G T G G A T C T G G G		
CRA	A A A G T A G T A G A T C C T T C C T G T G G A T C T G G A		
DMT	A A A A T C A T T G A C C C G A G C T G C G G T A G C G G C		
	340	350	360
CAU	A A T T T A A T T T G T A A G T G C T T T C T A T A T T T A		
CLJ	A A T T T A A T T T G T A A G T G C T T T C T A T A T T T A		
CRA	A A T T T A A T T T G T A A G T G C T T T C T A T A C T T A		
DMT	A A T C T G A T T T G C A A A T S T T T T C T G T A T C T G		
	370	380	390
CAU	A A T C G A A T A T T T A T T A A A G A A T A T T G A A T T T		
CLJ	A A T C G A A T A T T T A T T A A A G A A T A T T G A A T T T		
CRA	A A T C A A A T A T T C A T T A A A A A A T A T T G A A T T T		
DMT	A A T C G C A T C T T A T T A T T A A A G A A C A T T G A G G T G		
	400	410	420
CAU	A T A A A T A G T A A A A A C A A T T T A A A T T T G A A A		
CLJ	A T A A A T A G T A A A A A C A A T T T A A A T T T G A A A		
CRA	A T A A A T A G T A A A A A T A A T T T A A A T T T G A A A		
DMT	A T T A A C A G C A A A A A T A A C C T G A A T C T G A A A		
	430	440	450
CAU	C T A G A A G A T A T A A G T T A C C A T A T A G T A C G T		
CLJ	C T A G A A G A T A T A A G T T A C C A T A T A G T A C G T		
CRA	C T A A A A G A T A T A A G T T A C C A T A T A G T A C A T		
DMT	C T G G A A G A C A T C A G C T A C C A C A T C G T T G C G C		
	460	470	480
CAU	A A C A A T C T A T T T G G A T T T T G A T A T A G A T G A A		
CLJ	A A C A A T C T A T T T G G A T T T T G A T A T A G A T G A A		
CRA	A A C A A T C T A T T T G G A T T T T G A T G T A G A T G A A		
DMT	A A C A A T C T G T T T G G C T T C G A T A T T G A C G A A		
	490	500	510
CAU	A C T G C A A T A A A A G T T T T A A A A A A T A G A C T T A		
CLJ	A C T G C A A T A A A A G T T T T A A A A A A T A G A C T T A		
CRA	A C T G C A A T A A A A G T T T T A A A A A A T A G A C T T A		
DMT	A C C G C G A T C A A A G T G C T G A A A A A T T G A T C G		
	520	530	540
CAU	T T T T T G A T T A G C A A T C A G T T T A G T T G A A A A A		
CLJ	T T T T T G A T T A G C A A T C A G T T T A G T T G A A A A A		
CRA	T T T T T G A T T A G C A A T C A G T T T A G T T G A A A A A		
DMT	T T T C T G A T C A G C A A C C A A T T T A G C G A G A A A		
	550	560	570
CAU	A A T T T T C A A A T A A A G G A T T T T C T A G T G G A A		
CLJ	A A T T T T C A A A T A A A G G A T T T T C T A G T G G A A		
CRA	A A T T T T C A A A T A A A G G A T T T T C T A G T G G A A		
DMT	A A T T T C C A G G T T A A A A C T T T T C T G G T G G A A		
	580	590	600
CAU	A A T A T A G A T A G A A A A T A T G A T G T G T T T A T A		
CLJ	A A T A T A G A T A G A A A A T A T G A T G T G T T T A T A		
CRA	A A T A T A G A T A G A A A A T T T G A T G T G T T T A T A		
DMT	A A T A T T G A T C G C A A A T A T G A C G T G T T C A T T		

FIG. 4a cont.



		610	620	630
CAU	GGAAATCCCTCCG	TATAATAGG	ACAT	AAAATCTT
CLJ	GGAAATCCCTCCG	TATAATAGG	ACAT	AAAATCTT
CRA	GGAAATCCCTCCG	TATAATAGG	ACAT	AAAATCTT
DMT	GGTAAATCCGG	CCG	TATAATCGG	TCACAAAGC
		640	650	660
CAU	GTAAATTTCT	AGTT	AATTC	ATATGTTT
CLJ	GTAAATTTCT	AGTT	AATTC	ATATGTTT
CRA	GTAAATTTCT	AGTT	AATTC	ATATGTTT
DMT	GTAAATTTCT	AGTT	AATTC	ATATGTTT
		670	680	690
CAU	AAAAATATAT	GGAAAGT	ATAAT	AGAGACAAA
CLJ	AAAAATATAT	GGAAAGT	ATAAT	AGAGACAAA
CRA	AAAAATATAT	GGAAAGT	ATAAT	AGAGACAAA
DMT	AAAAATATAT	GGAAAGT	ATAAT	AGAGACAAA
		700	710	720
CAU	GGAAAGACATA	TCTCT	ACTGTTT	TTTTCAAA
CLJ	GGAAAGACATA	TCTCT	ACTGTTT	TTTTCAAA
CRA	GGAAAGACATA	TCTCT	ACTGTTT	TTTTCAAA
DMT	GGAAAGACATA	TCTCT	ACTGTTT	TTTTCAAA
		730	740	750
CAU	TCTATTTAA	AAAGT	TTTAA	AGGAGGAA
CLJ	TCTATTTAA	AAAGT	TTTAA	AGGAGGAA
CRA	TCTATTTAA	AAAGT	TTTAA	AGGAGGAA
DMT	TCTATTTAA	AAAGT	TTTAA	AGGAGGAA
		760	770	780
CAU	CTGCTGTTT	TTTCT	TTCT	TAAGGTA
CLJ	CTGCTGTTT	TTTCT	TTCT	TAAGGTA
CRA	CTGCTGTTT	TTTCT	TTCT	TAAGGTA
DMT	CTGCTGTTT	TTTCT	TTCT	TAAGGTA
		790	800	810
CAU	GAATCTTTG	CAAGG	AAAGAA	ACTTA
CLJ	GAATCTTTG	CAAGG	AAAGAA	ACTTA
CRA	GAATCTTTG	CAAGG	AAAGAA	ACTTA
DMT	GAATCTTTG	CAAGG	AAAGAA	ACTTA
		820	830	840
CAU	TTTTTTAA	ATTTG	AAAAAT	TACTCTCT
CLJ	TTTTTTAA	ATTTG	AAAAAT	TACTCTCT
CRA	TTTTTTAA	ATTTG	AAAAAT	TACTCTCT
DMT	TTTTTTAA	ATTTG	AAAAAT	TACTCTCT
		850	860	870
CAU	ATTTATATG	ATTTT	ATGGT	ATAA
CLJ	ATTTATATG	ATTTT	ATGGT	ATAA
CRA	ATTTATATG	ATTTT	ATGGT	ATAA
DMT	ATTTATATG	ATTTT	ATGGT	ATAA
		880	890	900
CAU	AAAAAGAG	GTAA	GGTATA	GACCC
CLJ	AAAAAGAG	GTAA	GGTATA	GACCC
CRA	AAAAAGAG	GTAA	GGTATA	GACCC
DMT	AAAAAGAG	GTAA	GGTATA	GACCC

FIG. 4a cont.

		910		920		930
CAU	T T T T T A G T A A G A A C A A A A A A T T T G G A A C A A T					
CLJ	T T T T T A G T A A G A A C A A A A A A A A T T T G G A A C A A T					
CRA	T T T T T A G T A A G A A C A A A A A A A A T T T G G G A C A A T					
DMT	T T T C T G G T T C G T A C G A A G A A A C C C C A A C A C A A T					
		940		950		960
CAU	A A T A T A G A A A T C A T A A A G A C C C A A T A A A A A T T					
CLJ	A A T A T A G A A A T C A T A A A G A C C C A A T A A A A A T T					
CRA	A A T A T A G A A A T C A T A A A G A C C C A A T A A A A A G T					
DMT	A A C A T T T A A A A T T A T T C G C C C G A A C A A G A T T					
		970		980		990
CAU	G A A A A A A A A T T A A A A A A A A T T A A A A T T C C T T G A T					
CLJ	G A A A A A A A A T T A A A A A A A A T T A A A A T T C C T T G A T					
CRA	G A A A A A G A A T T A A A A A A A A T T A A A A T T C C T T G A T					
DMT	G A A A A A G A A C C A A A A A G A A C A A A A T T C C T T G A T					
		1,000				
CAU	T T C C T T T T T T T T T T					
CLJ	T T C C T T T T T T T T T T					
CRA	T T C T T T T T T C T T T T					
DMT	A G C C C C C C C C C C					

FIG. 4a cont.

```

                                1,010                                1,020
                                TAGATAAATCTGAAAAATGCI
                                TAGATAAATCTGAAAAATGCI
                                TAGATAAATCTGAAAAATGCI
                                TGGACAAAAGCGAAAAGTGT
                                1,030                                1,040                                1,050
CAU AAAAAAGTTTTCTATTTCCTCAAAAGTCTATA
CLJ AAAAAAGTTTTCTATTTCCTCAAAAGTCTATA
CRA AAAAAAGTTTTCTATTTCCTCAAAAGTCTATA
DMT AAAAAAGTTTTAGCATTAGCCAGGAAAAGCATT
                                1,060                                1,070                                1,080
CAU AATAAATTGATGGATGGGGTATTTTGTTGACGAA
CLJ AATAAATTGATGGATGGGGTATTTTGTTGACGAA
CRA AATAGTTGATGGATGGGGTATTTTGTTAATGAA
DMT AATAAATCGATGGCTGGGGTTTTCGGTGACGAA
                                1,090                                1,100                                1,110
CAU GTTGAGAAAAAATATAATAGATAAAAATAAA
CLJ GTTGAGAAAAAATATAATAGATAAAAATAAA
CRA GTTGAGAAAAAATATAATAGGATAAAAATAAA
DMT GTTGAGAAAAAATATAATAGGATAAAAATAAA
                                1,120                                1,130                                1,140
CAU GATAAAAAGTAAATTTTATTTTAAAGGATAATA
CLJ GATAAAAAGTAAATTTTATTTTAAAGGATAATA
CRA GATAAAAAGTAAATTTTATTTTAAAGGATAATA
DMT GATAAAAAGCTAAGTTTCATTCGAAAGATATT
                                1,150                                1,160                                1,170
CAU TGGCCATAGTTTGTTCAGGGTTATAATAACGGGA
CLJ TGGCCATAGTTTGTTCAGGGTTATAATAACGGGA
CRA TGGCCATAGTTTGTTCAGGGTTATAATAACGGGA
DMT TGGCCATAGCTGTTCAGGGCATTTATCACCGGT
                                1,180                                1,190                                1,200
CAU TGTGATAAAGGCTTTTATAAGTTTGAATAAGAAC
CLJ TGTGATAAAGGCTTTTATAAGTTTGAATAAGAAC
CRA TGTGATAAAGGCTTTTATAAGTTTGAATAAGAAC
DMT TGTGATACGGCGCTTTTATTTGTGGACCCTGAT

```

FIG. 4b

		1,210	1,220	1,230
CAU	A	U	U	G
CLJ	A	U	U	G
CRA	A	C	U	G
DMT	A	U	U	G
		1,240	1,250	1,260
CAU	U	U	A	A
CLJ	U	U	A	A
CRA	U	U	A	A
DMT	C	U	U	A
		1,270	1,280	1,290
CAU	A	U	U	G
CLJ	A	U	U	G
CRA	A	U	U	G
DMT	A	U	U	G
		1,300	1,310	1,320
CAU	A	A	A	T
CLJ	A	A	A	T
CRA	A	A	A	T
DMT	A	A	A	T
		1,330	1,340	1,350
CAU	A	A	T	G
CLJ	A	A	T	G
CRA	A	A	T	G
DMT	A	A	T	G
		1,360	1,370	1,380
CAU	T	A	T	A
CLJ	T	A	T	A
CRA	T	A	T	A
DMT	T	A	T	A
		1,390	1,400	1,410
CAU	G	S	A	A
CLJ	G	S	A	A
CRA	G	S	A	A
DMT	G	S	A	A
		1,420	1,430	1,440
CAU	U	A	A	G
CLJ	U	A	A	G
CRA	U	A	A	G
DMT	T	A	A	G
		1,450	1,460	1,470
CAU	A	C	C	A
CLJ	A	C	C	A
CRA	A	C	C	A
DMT	A	C	C	A
		1,480	1,490	1,500
CAU	G	T	T	C
CLJ	G	T	T	C
CRA	A	T	T	C
DMT	T	T	T	C

FIG. 4b cont.

		1,510	1,520	1,530
CAU	TTGCTCTTGACCAAGGGGAAGCTACTTTAGTGGC			
CLJ	TTGCTCTTGACCAAGGGGAAGCTACTTTAGTGGC			
CRA	TTGCTCTTGATTAAGGGGAAGCTACTTTAGTGGC			
DMT	TTGACTGGATTAAGGGGTAGCTACTTTAGCCGC			
		1,540	1,550	1,560
CAU	AGATATATAATTCCTTATAATAAATAAAAA			
CLJ	AGATATATAATTCCTTATAATAAATAAAAA			
CRA	AGATATATAATTCCTTATAATAAATAAAAA			
DMT	AGACATTTAATAAGCTCTGGTTCTGAAGAAAAA			
		1,570	1,580	1,590
CAU	TGTAACTTTTACCTATGAAATAACTTTTAA			
CLJ	TGTAACTTTTACCTATGAAATAACTTTTAA			
CRA	TGTAACTTTTACCTATGAAATAACTTTTAA			
DMT	TGTGCGCGTTCACCTATGAGGATCCGCGCGAA			
		1,600	1,610	1,620
CAU	TATATTTTAAACAGTTCCTTTTGTATGAAATTTTA			
CLJ	TATATTTTAAACAGTTCCTTTTGTATGAAATTTTA			
CRA	TATATTTTAAATAGTTTCTTTTGTATGAAATTTTA			
DMT	TATCTCTGGAATAGCTCTGGCTGTACGAGTPTTA			
		1,630	1,640	1,650
CAU	CTTTAAATAACTTTTCGGCAAAAAAATAATAGGAGA			
CLJ	CTTTAAATAACTTTTCGGCAAAAAAATAATAGGAGA			
CRA	CTTTAAATAACTTTTCGGGGAAAAAATAATAGGAGA			
DMT	CTTTAAAGAGCTTTTCGGCGAAAAAAGCTGGGCGGA			
		1,660	1,670	1,680
CAU	AAATCTATAAATGAGTATTAACCTTAAATAATCT			
CLJ	AAATCTATAAATGAGTATTAACCTTAAATAATCT			
CRA	AAATCTATAAATGAGTATTAATCCTTAAATAATCT			
DMT	GAAATCTGACGAGTACTATCCCGAACCAACCT			
		1,690	1,700	1,710
CAU	AATGAAATAATTTGTTTAAATTCCTTCTATTTAATTT			
CLJ	AATGAAATAATTTGTTTAAATTCCTTCTATTTAATTT			
CRA	GATGAAATAATTTGTTTAAATTCCTTCTATTTCGTTT			
DMT	GATGAAAGCTTTGTTTCAACCCCGAGCATCCGATTT			
		1,720	1,730	1,740
CAU	TTGTAAGTAAATAAATTAATAAATAAATAAAGCT			
CLJ	TTGTAAGTAAATAAATTAATAAATAAATAAAGCT			
CRA	TTCTAATAAATAAATTAATAAATAAATAAAGGT			
DMT	CTGCTCCTGTTGAGAACCAATAATTTAGAAAAAGCT			
		1,750	1,760	1,770
CAU	GTATGATTTTTTTGGGACTGACAGATAAAGGAA			
CLJ	GTATGATTTTTTTGGGACTGACAGATAAAGGAA			
CRA	GTATGATTTTTTTGGGGCTGACAGATAAAGGAA			
DMT	GTATGATTTTCTTTGGGTCTGACGGATAAAGAA			
		1,780	1,790	1,800
CAU	AATTGGAGATTGTAATAAATAAGATATAAAGATAA			
CLJ	AATTGGAGATTGTAATAAATAAGATATAAAGATAA			
CRA	AATTCAGATTGTAATAAATAAATAAATAAAGATAA			
DMT	AATTGGAGATTGTTGGAGAGAGATCCAAAGATAA			
		1,807		
CAU	TTGGCTGA			
CLJ	TTGGCTGA			
CRA	TTGGCTGA			
DMT	CTGGCTGA			

FIG. 4b cont.

FIG. 4c

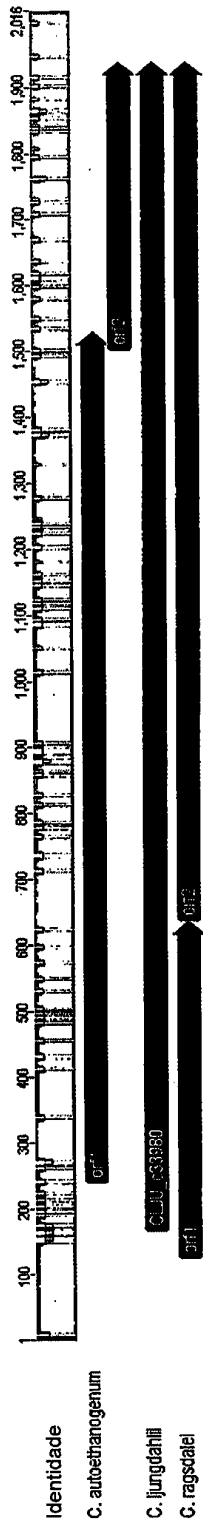


FIG. 4d

	1	1p	20	30	40	50	50	50	70	80	90	100
AU1												
AU2												
LJ												
RA1												
RA2												
MT												
AU1												
AU2												
LJ												
RA1												
RA2												
MT												
AU1												
AU2												
LJ												
RA1												
RA2												
MT												
AU1												
AU2												
LJ												
RA1												
RA2												
MT												
AU1												
AU2												
LJ												
RA1												
RA2												
MT												
AU1												
AU2												
LJ												
RA1												
RA2												
MT												
AU1												
AU2												
LJ												
RA1												
RA2												
MT												
AU1												
AU2												
LJ												
RA1												
RA2												
MT												
AU1												
AU2												
LJ												
RA1												
RA2												
MT												
AU1												
AU2												
LJ												
RA1												
RA2												
MT												
AU1												
AU2												
LJ												
RA1												
RA2												
MT												

692  
 693  
 694  
 695

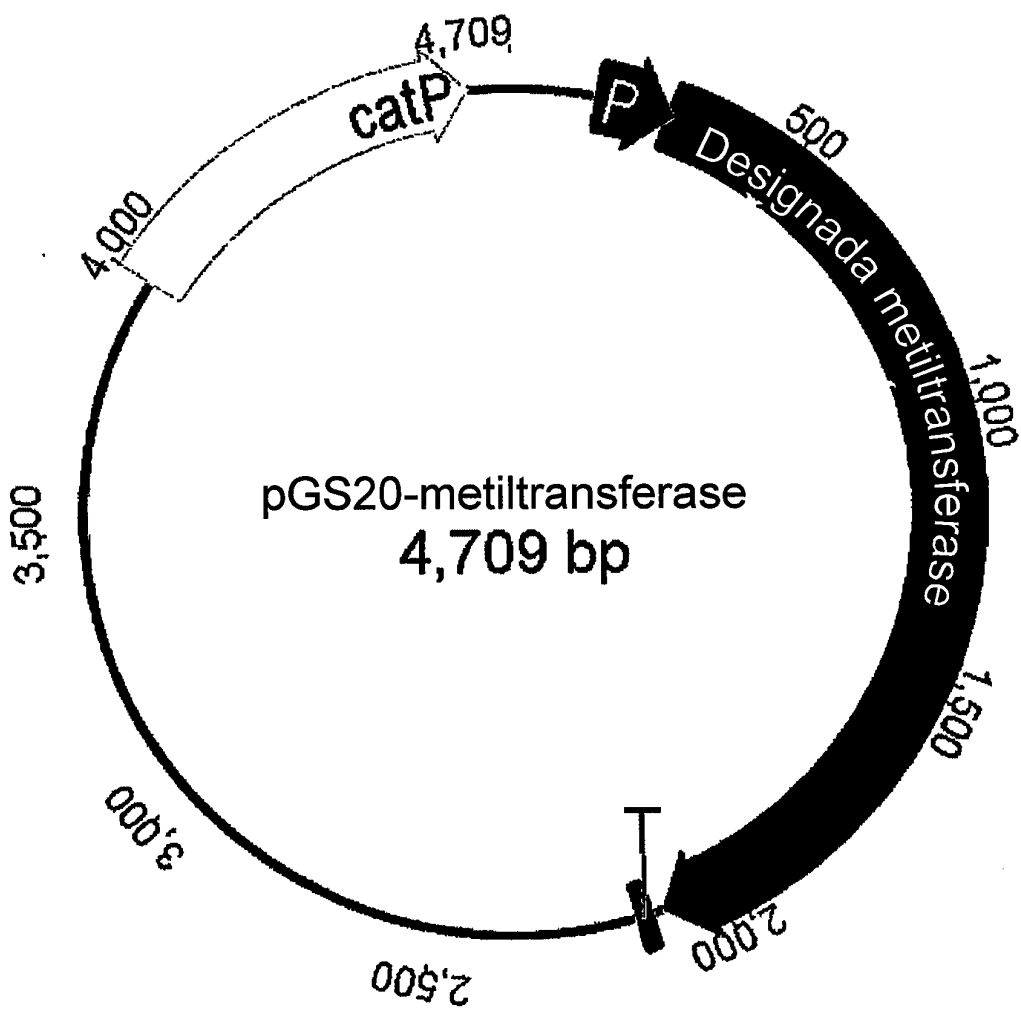


FIG. 5



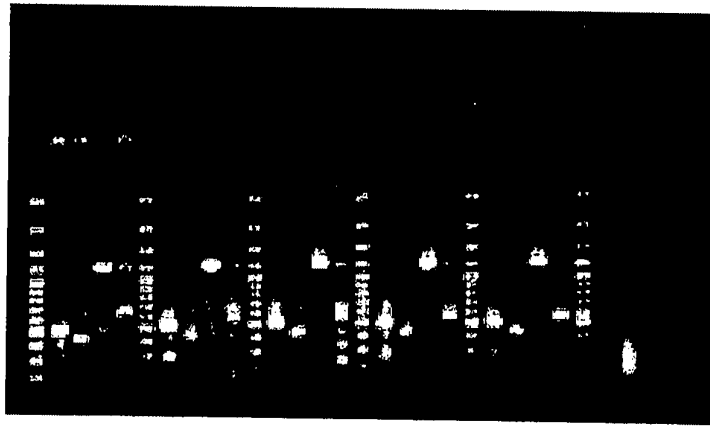


FIG. 6

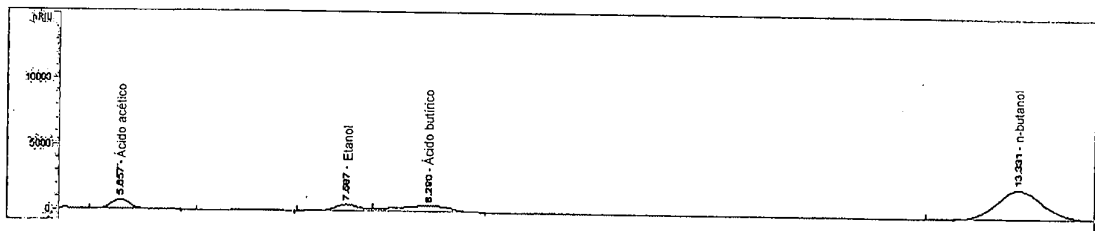


FIG. 7

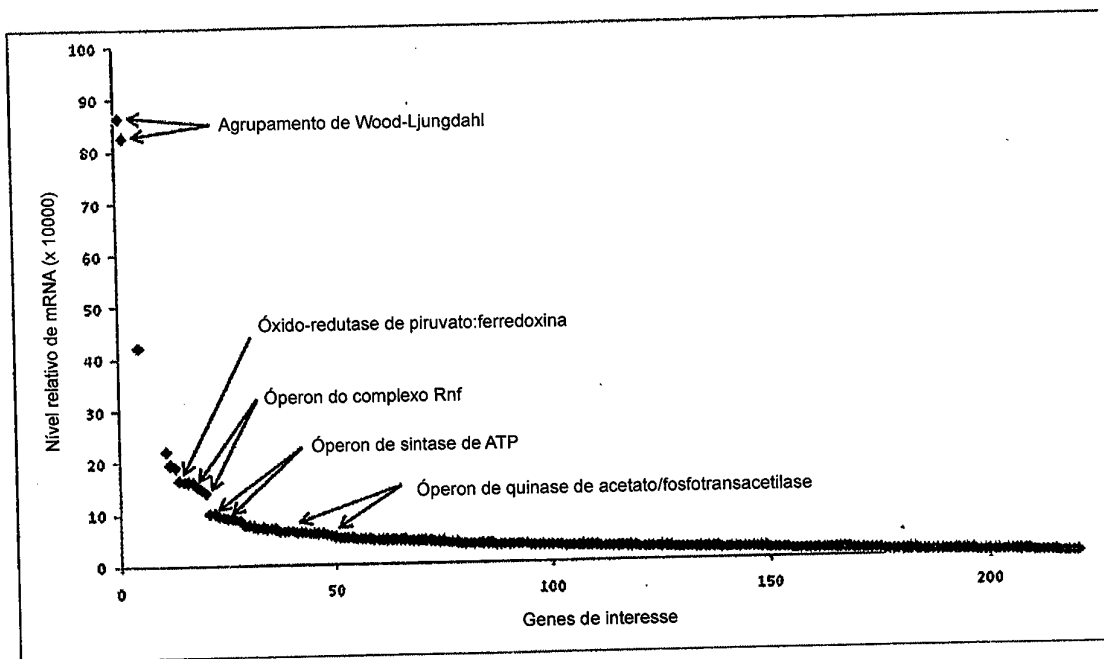


FIG. 8

Seq. ID 1: gene de tiolase (*thlA*) de *Clostridium acetobutylicum* ATCC824:

ATGAAAGAAGTTGTAATAGCTAGTGCAGTAAGAACAGCGATTGGATCTTATGGAAAGTCTCTTAAGGATGTACCAGCAGTAG  
 ATTTAGGAGCTACAGCTATAAAGGAAGCAGTTAAAAAGCAGGAATAAAACCAGAGGATGTTAATGAAGTCATTTTAGGAA  
 ATGTTCTTCAAGCAGGTTTAGGACAGAATCCAGCAAGACAGGCATCTTTAAAGCAGGATTACCAAGTTGAAATCCAGCTATG  
 ACTATTAATAAGGTTTGTGGTTCAGGACTTAGAACAGTTAGCTTAGCAGCACAATTATAAAAGCAGGAGATGCTGACGTAA  
 TAATAGCAGGTGGTATGGAAAATATGTCTAGAGCTCTTACTTAGCGAATAACGCTAGATGGGGATATAGAATGGGAAACGC  
 TAAATTTGTTGATGAAATGATCACTGACGGATTGTGGGATGCATTTAATGATTACCACATGGGAATAACAGCAGAAAAATA  
 GCTGAGAGATGGAAACATTTCAAGAGAAGAACAAGATGAGTTTCTTGCATCACAATAAAGCTGAAGAAGCTATAAAAT  
 CAGGTCATTTAAAGATGAAATAGTTCTGTAGTAATTAAGGCAGAAAGGGAGAACTGTAGTTGATACAGATGAGCACCC  
 TAGATTTGGATCAACTATAGAAGGACTTGCAAAATTAACCTGCCTTCAAAAAGATGGAAACAGTTACAGCTGGTAATGCAT  
 CAGGATTAATGACTGTGCAGCAGTACTTGAATCATGAGTGCAGAAAAGCTAAAGAGCTTGGAGTAAAACCACTTGCTAA  
 GATAGTTCTTATGGTTGAGCAGGAGTTGACCCAGCAATAATGGGATATGGACCTTCTATGCAACAAAAGCAGCTATTGAAA  
 AAGCAGGTTGGACAGTTGATGAATTAGATTAATAGAATCAAATGAAGCTTTTGCAGCTCAAAGTTTAGCAGTAGCAAAAGA  
 TTTAAATTTGATATGAATAAAGTAAATGTAATGGAGGAGCTATTGCCCTTGGTCAATCAATGGAGCATCAGGTGCAAGA  
 ATACTCGTACTCTTGTACACGCAATGCAAAAAGAGATGCAAAAAGGCTTAGCAACTTTATGTATAGTGGCGGCAAGA  
 GAACAGCAATATTGCTAGAAAAGTGCTAG

Seq. ID 2: gene de deidrogenase de hidróxibutiril-CoA de *Clostridium acetobutylicum* ATCC8243:

ATGAAAAAGGTATGTTATAGGTGCAGGTAAGGTTGCTCAGGCATTTGCAGCTAAAGGATTTGAAGTAG  
 TATTAAGAGATATTAAGATGAATTTGTTGATAGAGGATTAGTTTTATCAATAAAAACTTTCTAAATTAGTTAAAAAGGA  
 AAGATAGAAGAAGCTACTAAAAGTTGAAATCTTAAGTAAATTTCCGGAACAGTTGACCTTAATATGGCAGCTGATTGCGATT  
 AGTTATAGAAGCAGCTGTTGAAAGAATGGATATTAAGAGCAGATTTTGTGACTTAGACAATATATGCAAGCCAGAAAACA  
 ATTCTTGATCAATACATCATCACTTTCAATAACAGAAGTGGCATCAGCAACTAAAAGACCTGATAAGGTTATAGGTATGCA  
 TTTCTTTAATCCAGCTCCTGTTATGAAGCTTGTAGAGGTAATAAGAGGAATAGCTACATCACAAGAACTTTTGTATGCA  
 AAGAGACATCTATAGCAATAGGAAAAGATCCTGTAGAAGTAGCAGAAGCACCAGGATTTGTTGTAATAGAATATTAATACC  
 AATGATTAATGAAGCAGTTGGTATATTAGCAGAAGGAATAGCTTCAAGTAAAGCAGGATTTGTTGTAATAGAATATTAATACC  
 AATCACCCTAATGGGACCATTAGAATAGGTTATAGGTTGATATATGCTTGTCTATAATGGATGTTTTATACTCAGAA  
 ACTGGAGATTCTAAGTATAGCCACATACATTACTTAAGAAGTATGTAAGAGCAGGATGGCTTGGAAAGAAAATCAGGAAAA  
 GGTTCTACGATTATCAAAATAA

Seq. ID 3: crotonase (*crt*) de *Clostridium acetobutylicum* ATCC824:

ATGGAACATAACAATGTCATCCTTGAAGGAAGGTAAGTTGCTGTAGTTACCATTAAACAGACCTAAAGCATTAAATGCGTT  
 AAATAGTGATACACTAAAAGAAATGGATTATGTTATAGGTGAAATTGAAATGATAGCGAAGTACTTGCAGTAATTTAACTG  
 GAGCAGGAGAAAAATCATTTGTAGCAGGAGCAGATATTTCTGAGATGAAGGAAATGAATACCAATGAAGGTAGAAAATTCG  
 GGATACTTGGAAATAAAGTGTGTTAGAAGATTAGAATCTTGTAAAAGCCTGTAATAGCAGCTGTTAATGGTTTTGCTTTAGGA  
 GCGGATGCGAAATAGCTATGCTTGTGATATAAGAATAGCTTCAAGCAACGCAAGATTTGGTCAACCAGAAGTAGGTCTCG  
 GAATAACACCTGGTTTTGGTGGTACACAAGACTTTCAAGATTAGTTGGAATGGGCATGGCAAAGCAGCTTATTTACTGCA  
 CAAAATATAAAGGCAGATGAAGCATTAAAGAATCGGACTTGTAAATAAGGTAGTAGAACCTAGTGAATTAATGAATACAGCAA  
 AAGAAATTGCAACAAAATTTGAGCAATGCTCCAGTAGCTGTTAAGTTAAGCAACAGGCTATTAATAGAGGAATGCAGTG  
 TGATATTGATACTGCTTAGCATTGAATCAGAAGCATTGGAGAATGCTTTTCAACAGAGGATCAAAGGATGCAATGACAG  
 CTTTCATAGAGAAAAGAAAATTTGAAGGCTTCAAAAATAGATAG

FIG. 9

Seq. ID 4: deidrogenase de butiril-CoA (*bcd*) de *Clostridium acetobutylicum* ATCC824:

ATGGATTTTAATTTAACAAGAGAACAAGAATTAGTAAGACAGATGGTTAGAGAATTTGCTGAAAATGAAGTTAAACCTATAG  
CAGCAGAAAATTGATGAAACAGAAAGATTTCCAATGGAAAATGTAAGAAAATGGGTCAGTATGGTATGATGGGAATCCATT  
TTCAAAGAGTATGGTGGCGCAGGTGGAGATGTATTATCTTATATAATCGCCGTTGAGGAATTATCAAAGGTTTGC GG TACT  
ACAGGAGTTATTCTTTAGCACATACATCACTTTGTGCTTCATTAATAAATGAACATGGTACAGAAGAACAACAAAACAAAATA  
TTAGTACCTTTAGCTAAAGGTGAAAAAATAGGTGCTTATGGATTGACTGAGCCAATGCAGGAACAGATTCTGGAGCACAA  
CAACAGTAGCTGTACTTGAAGGAGATCATTATGTAATTAATGGTTCAAAAATATTATACTAATGGAGGAGTTGCAGATAC  
TTTTGTTATATTTGCAATGACTGACAGAACTAAAGGAACAAAAGGTATATCAGCATTATAATAGAAAAAGGCTTCAAAGGTT  
TCTCTATTGGTAAAGTTGAACAAAAGCTTGAATAAGAGCTTCATCAACAACCTGAACTTGTATTGAAAGATATGATAGTACCA  
GTAGAAAACATGATTGGTAAAGAAGGAAAAGGCTTCCCTATAGCAATGAAAACCTTGTATGGAGGAAGAATTGGTATAGCA  
GCTCAAGCTTTAGGTATAGCTGAAGGTGCTTCAACGAAGCAAGAGCTTACATGAAGGAGAGAAAACAATTTGGAAGAAGC  
CTTGACAAATCCAAGGCTTGCATGGATGATGGCAGATATGGATGTAGCTATAGAATCAGCTAGATATTTAGTATATAAAGC  
AGCATATCTTAAACAAGCAGGACTTCCATACACAGTTGATGCTGCAAGAGCTAAGCTTCATGCTGCAAAATGTAGCAATGGAT  
GTAACAACCTAAGGCAGTACAATTTGGTGGATACGGATATACAAAAGATTATCCAGTTGAAAGAATGATGAGAGATGCTA  
AGATAACTGAAATATATGAAGGAACTTCAGAAGTTCAGAAATTAGTTATTTTCAGGAAAAATTTTAGATAA

Seq. ID 5: flavoproteína de transferência de elétrons (*effA*) de *Clostridium acetobutylicum* ATCC824:

ATGAATAAAGCAGATTACAAGGGCGTATGGGTGTTTCTGAAACAAAGAGACGGAGAATTACAAAAGGTATCATTGGAATTA  
TTAGGTAAAGGTAAGGAAATGGCTGAGAAATAGGCGTTGAATTAACAGCTGTTTTACTTGGACATAATACTGAAAAAATGT  
CAAAGGATTTATTATCTCATGGAGCAGATAAGGTTTTAGCAGCAGATAATGAACTTTTAGCACATTTTCAACAGATGGATAT  
GCTAAAGTTATATGTGATTTAGTTAATGAAAGAAAGCCAGAAATATTATTATAGGAGCTACTTTTATAGGAAGAGATTTAGG  
ACCAAGAATAGCAGCAAGACTTTCTACTGGTTTAACTGCTGATTGTACATCACTTGCATAGATGTAGAAAATAGAGATTTAT  
TGGCTACAAGACCAGCGTTTTGGTGGAAATTTGATAGCTACAATAGTTTGTTCAGACCACAGACCACAAATGGCTACAGTAAG  
ACCTGGTGTGTTTTGAAAAATTACCTGTTAATGATGCAAAATGTTTCTGATGATAAAAATAGAAAAGTTGCAATTAATTAACAG  
CATCAGACATAAGAACAAAAGTTTCAAAGTTGTTAAGCTTGTCAAAGATATTGCAGATATCGGAGAAGCTAAGGTATTAGTT  
GCTGGTGGTAGAGGAGTTGGAAGCAAAGAAAACCTTGAAAAACCTTGAAGAGTTAGCAAGTTACTTGGTGGAAACAATAGCC  
GCTTCAAGAGCAGCAATAGAAAAAGAATGGGTTGATAAGGACCTTCAAGTAGGTCAAAGTAACTGGTAAACTGTAAGACCAACT  
TTTATATTGCATGTGGTATATCAGGAGCTATCCAGCATTAGCAGGTATGCAAGATTAGATTACATAAATTGCTATAAATAAA  
GATGTAGAAGCCCAATAATGAAGGTAGCAGATTTGGCTATAGTTGGTGTATGATAAATAAAGTTGTACCAGAATTAATAGCTC  
AAGTTAAAGCTGCTAATAATTA

Seq. ID 6: flavoproteína de transferência de elétrons (*effB*) de *Clostridium acetobutylicum* ATCC824

ATGAATATAGTTGTTGTTTAAAAACAAGTTCCAGATACAGCGGAAGTTAGAATAGATCCAGTTAAGGGAACTTATAAGAG  
AAGGAGTTCCATCAATAATAAATCCAGATGATAAAAACGCACCTTGAAGGAACTTTAGTATTAAGATAAATTATGGTGCACAT  
GTAACAGTTATAAGTATGGGACCTCCACAAGCTAAAAATGCTTTAGTAGAAGCTTTGGCTATGGGTGCTGATGAAGCTGTACT  
TTTAAACAGATAGAGCATTGGAGGAGCAGATACACTTGGCAGCTTACATACAATTGCAGCAGGAATTAAGAAGCTAAAATAT  
GATATAGTTTTGCTGGAAGGCAGGCTATAGATGGAGATACAGCTCAGGTTGGACCAGAAATAGCTGAGCATCTTGGAAATC  
CTCAAGTAACTTATGTTGAGAAAAGTTGAAGTTGATGGAGATACTTAAAGATTAGAAAAGCTTGGGAAGATGGATATGAAGT  
TGTTGAAGTTAAGACACCAGTTCTTTAACAGCAATTAAGAATTAATGTTCCAAGATATATGAGTGTAGAAAAAATATTCG  
GAGCATTGATAAAGAAGTAAAAATGTGGACTGCCGATGATATAGATGTAGATAAGGCTAATTTAGGCTTAAAGGTTCAAC  
AACTAAAGTTAAGAAGTCATCAACTAAAGAAGTTAAAGGACAGGGAGAAGTTATTGATAAGCCTGTTAAGGAAGCAGCTGC  
ATATGTTGTCTCAAAATTAAGAAGAACACTATATTTAA

FIG. 10

Seq. ID 7: região promotora de quinase de acetato/fosfotransacetilase (*P<sub>pta-ack</sub>*) de *Clostridium autoethanogenum* DSM10061:

GAGCGGCCGCAATATGATATTTATGTCCATTGTGAAAGGGATTATATTCAACTATTATTCCAGTTACGTTTCATAGAAATTTCC  
 TTTCTAAAATATTTTATCCATGTCAAGAACTCTGTTTATTTTCATTAAGAACTATAAGTACAAAGTATAAGGCATTTGAAAA  
 ATAGGCTAGTATATTGATTGATTATTTATTTTAAATGCCTAAGTAAATATATACATATTATAACAATAAAAATAGTATTAGT  
 GTAGGATTTTAAATAGAGTATCTATTTTCAGATTAATTTTTGATTATTTGATTTACATTATATAATATTGAGTAAAGTATTGA  
 CTAGCAAAATTTTTGATACTTTAATTTGTGAAATTTCTATCAAAGTTATATTTTTGAATAATTTTTATTGAAAAATACAATA  
 AAAAGGATTATAGTATAAGTGTGTGAATTTTGTGTTAAATTTAAAGGGAGGAAATGAACATGAAACATATGGAA

Seq. ID 47: promotor do agrupamento de Wood-Ljungdahl:

AAAGCGGCCGCAAAATAGTTGATAATAATGCAGAGTTATAAACAAAGGTGAAAAGCATTACTTGTATTCTTTTTATATATTAT  
 ATAAATAAAATGAAGCTGTATTAGAAAAATACACACCTGTAATATAAAATTTTAAATTAATTTTTAAATTTTTCAAAATGTAT  
 TTTACATGTTTGAATTTTGTATGATATTTAAATAGTAGAATACATAAGATACTTAATTTAATTAAGATAGTTAAGTACTTTTC  
 AATGTGCTTTTTAGATGTTTAAATCAAACTTTAATTTGAAAAGAAATGCTGTACTTTTACTGTACTAGTGACGGGATTAAA  
 CTGTATTAATATAAATAAAAAATAAGTACAGTTGTTTAAATTTATTTTTGTATTAATCTAATAGTACGATGTAAGTTATTTT  
 ATACTATTGCTAGTTTAAATAAAAAGATTTAATTATATGCTTGAAGGAGAGGAATCCATATGCGTA

Seq. ID 48: promotor de óxido-redutase de piruvato:ferredoxina:

ATACCATAAATTACTTGAAAAATAGTTGATAATAATGTAGAGTTATAAACAAAGGTGAAAAGCATTACTTGTATTCTTTTTAT  
 ATATTATAAATTAATGAAGCTGTATTAGAAAAATACACACCTGTAATATAAAATTTTAAATTAATTTTTAAATTTTTCA  
 AAATGATTTTACATGTTTGAATTTTGTATGATATTTAAATAGTAGAATACATAAGATACTTAATTTAATTAAGATAGTTAA  
 GTACTTTTCAATGTGCTTTTTAGATGTTTAAATCAAACTTTAATTTGAAAAGAAATGCTGTACTTTTACTGTACTAGTGACG  
 GGATTAACCTGATTAATTAATAAATAAAAAATAAGTACAGTTGTTTAAATTTATTTTTGTATTAATCTAATAGTACGATGTA  
 AGTTATTTTATACTATTGCTAGTTTAAATAAAAAGATTTAATTATATACTTGAAGGAGAGGAATTTTTATGCGTAAA

Seq. ID 49: promotor do óperon Rnf:

TAGAAAAACATGTATACAAAATTAAAAACTATTATAACACATAGTATCAATATTGAAGGTAATACTGTTCAATATCGATACA  
 GATAAAAAAATATATAATACAGAAGAAAAAATTATAAATTTGTGGTATAATATAAAGTATAGTAATTTAAGTTTAAACCTCG  
 TGA AACGCTAACAAATAATAGGAGGTGATTAT

Seq. ID 50: promotor do óperon de sintase de ATP

ATCTGTATATTTTTCCCATTTTAATTTTGTACTATAATATTACACTGAGTGTATTGTATATTTAAAAAATTTGGTACAATT  
 AGTTAGTTAAATAAATCTAAATTTGAAATTTATCAGAATCCTTATTAAGGAAATACATAGATTTAAGGAGAAATCATAAAAAG  
 GTGTAATATAAACTGGCTAAAAATGAGCAAAAAATGAGCAATTAAGACTTTTTGATTGTATCTTTTTATATATTTAAGGTATAT  
 AATCTTATTTATATTTGGGGAACTTGATGAATAACATATTCTAGAC

FIG. 11

Seq. ID 14: vetor de transporte de *E. coli*-*Clostridium* pMTL 85141:

CCTGCAGGATAAAAAAATTGTAGATAAAATTTTATAAAATAGTTTTATCTACAATTTTTTATCAGGAAACAGCTATGACCGCGG  
 CCGCTGTATCCATATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACGTCACGCGTCCATGGAG  
 ATCTCGAGGCTGCAGACATGCAAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCA  
 ACTTAATCGCCTTGCAACATCCCCTTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGGCCGACCGATCGCCCTTCCCAACAGT  
 TGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGTAGCATAAAAATAAGAAGCCTGCATTTGCAGGCTTCTATTTTTATGGCGCGCCGC  
 ATTCACCTTTTTCTATATAAATATGAGCGAAGCGAATAAGCGTCGGAAAAGCAGCAAAAAGTTCCCTTTTTGCTGTTGGAGC  
 ATGGGGGTTTACGGGGTGCAGTATCTGACGTCATGCCGAGCGAAAAGCGCCGAAGGGTAGCATTACGTTAGATAACCC  
 CCTGATATGCTCCGACGCTTATATAGAAAAGAAGATCAACTAGGTAAAAATCTTAATATAGGTTGAGATGATAAGGTTTATA  
 AGGAATTTGTTTCTAATTTTTCACTCATTTTTGTTCTAATTTCTTTTAAACAATGTTCTTTTTTTTTAGAACAGTTATGATATA  
 GTTAGAATAGTTTAAAATAAGGAGTGAGAAAAAGATGAAAGAAAGATATGGAACAGTCTATAAAGGCTCTCAGAGGCTCAT  
 AGACGAAGAAAAGTGGAGAAGTCATAGAGGTAGACAAGTTATACCGTAAACAAACGTCGTTGTAACCTCGTAAAGGCATATAT  
 AGTGAATTAATAAGTATGTTAGATATGATTGGCGGAAAAAACTTAAATCGTTAACTATATCCTAGATAATGTCCACTTAA  
 GTAACAATAAATGATAGCTACAACAAGAGAAAATAGCAAAAGCTACAGGAACAAGTCAAAAACAGTAATAACAACACTTAA  
 AATCTTAGAAGAAGGAAATATTATAAAAAGAAAACTGGAGTATTAATGTTAAACCTGAACTACTAATGAGAGGCGACGAC  
 CAAAAACAAAATACCTCTACTCGAATTTGGGAACTTTGAGCAAGAGGCAAAATGAAATAGATTGACCTCCCAATAACACCAC  
 GTAGTTATTGGGAGGTCAATCTATGAAATGCGATTAAGGGCCGCGCAGTGGGCAAGTTGAAAAAATGATAAAAAATAGTTGG  
 AATATCTTTGTTTATTAGAGCGATAAATTTGAATTTGAGAGGGAAGTATGATGTTTGAATAAACCCTGAACTACTAATGAGAGGCGACGAC  
 AACAGAAAAGAGTATTTTGACCACTACTTTGCAAGTGTACCTTGACCTACAGCATGACCGTTAAAGTGGATATCACACAAAT  
 AAAGGAAAAGGGAATGAACTATATCCTGCAATGCTTTATTATATTGCAATGATTGTAACCGCCATTGAGATTTAGGACGG  
 CAATCAATCAAGATGGTGAATTGGGGATATATGATGAGATGATACCAAGCTATACAATTTTCAATGATACTGAAACATTT  
 TCCAGCCTTTGGACTGAGTGAAGTCTGACTTTAAATCATTTTTAGCAGATTATGAAAGTGATACGCAACGGTATGGAAACAA  
 TCATAGAATGGAAGGAAAGCCAAATGCTCCGAAAACATTTTTAATGTATCTATGATACCGTGGTCAACCTTCGATGGCTTTA  
 ATCTGAATTTGCAGAAAGGATATGATTATTTGATTCTATTTTTACTATGGGGAAATATTATAAAGAAGATAACAAAATTATAC  
 TTCCTTTGGCAATTCAGTTTCTGTAACCTAAAAACAAGTATTAAGCAAAAAACATCGTAGAAATACGGTGTTTTTTTGTTACCCTA  
 ATAGTTAACTTCAGGTTTGTCTGTAACCTAAAAACAAGTATTAAGCAAAAAACATCGTAGAAATACGGTGTTTTTTTGTTACCCTA  
 AGTTTAAACTCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTAACGTGAGTTTTCTGTTCCACTGAGCGTCAGACCCGTAGAAA  
 AGATCAAAGGATCTTCTGAGATCCTTTTTCTGCGCCTAATCTGCTGCTTGCAAAACAAAAAACCCAGCTACCAGCGGTG  
 GTTTGTTTGGCGGATCAAGAGCTACCAACTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAAGAGGATACCTACATACCTCGCTGCTAATCCTGTTACCAGTG  
 CTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCCTTCAAGAACTCTGTAGCACCCTACATACCTCGCTGCTAATCCTGTTACCAGTG  
 GCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGTCTTACCGGGTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCCGGC  
 TGAACGGGGGTTCTGTCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGA  
 GAAAGCGCCACGCTTCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCCGGAACAGGAGAGCGCACGA  
 GGGAGCTTCCAGGGGAAACGCTGATCTTTATAGTCTGTCCGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTTCGATTTTTGTGA  
 TGCTCGTACGGGGGGCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACCGCGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGTGCTGGCCTTTTGC  
 TCACATGTTCTTCTGCGTTATCCCCTGATTTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAG  
 CCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAAGTGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGACGGGCC

FIG. 12

Seq. ID 15: vetor de transporte de *E. coli*-*Clostridium* pMTL 82254:

CCTGCAGGATAAAAAATGTAGATAAATTTATAAAATAGTTTTATCTACAATTTTTATCAGGAAACAGCTATGACCGCGCGCGTGTATCCATATGGTATT  
 TGAAAAAATTGATAAAAAATAGTTGGAAACAGAAAAGAGTATTTGACCACTACTTTGCAAGTGTACCTGTACCTACAGCATGACCGTTAAAGTGGATATCACAC  
 AAATAAAGGAAAAGGGAATGAAACTATATCCTGCAATGCTTTATTATATTGCAATGATTGTAACCCGCAATTCAGAGTTTAGGACGGCAATCAATCAAGATGG  
 TGAATGGGGATATATGATGAGATGATACCAAGCTATACAATATTTACAAATGATACTGAAACATTTCCAGCCTTTGGACTGAGTGAAGTCTGACTTTAAAT  
 CATTGTTAGCAGATTATGAAAAGTATACGCAACCGTATGAAACAATCATAGAATGGAAAGGAAAGCCAAATGCTCCGAAAACATTTTTAATGTATCTATGAT  
 ACCGTGGTCAACCTTCGATGGCTTAATCTGAATTTGCGAAAGGATATGATTATTTGATTCTATTTACTATGGGGAATATTATAAAGAAGATAACAAAAT  
 TATACTTCCCTTGGCAATCAAGTTCATCAGCGAGTATGACGCGATTTACATTTGCGCTTTGTAAACGAATGCGAGAAATTGATAAATAGTTAAACGCGTCC  
 ATGGAGATCTCGAGGCTGCAGACATGCAAGCTGGCAGTGGCCGCTGTTTACACGCTGCTGACTGGGAAAACCTGGCGTACCCAATTAATCGCTTGC  
 AGCACATCCCCCTTTGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCATCGCCCTCCCAACAGTTGCGCAGCTGAATGGCGAATGGCGTAGCATAAAA  
 AATAAGAAGCTGCAATTTGACGGCTCTAATTTTATGGCGCGCTTCTGAACTCTAGCTAATGTTCAACAGGTAACCTATGACGAAGATAGCACCCTGGAT  
 AAGTCTGTAATGGATTCTAAGGCATTTAATGAAGACGTGTATATAAATGTGCTAATGAAAAAGAAAATGCGTTAAAGAGCCTAAAATGAGTTCAAATGGTT  
 TTGAAATTGATTGGTAGTTAATTAATATATTTTTCTAATTGGCTATCTCGATACCTATAGAATCTTCTGTTCACTTTGTTTTGAAATATAAAAAGGGGCTTTT  
 TAGCCCCTTTTTAAAACTCCGGAGGATTTCTTCACTTCTGATACTATACGTAACATTTTCCGATTGACTTCAATGTAATTAAGCTAGTAAAATCAATGGTT  
 AAAAAACAAAACTGCAATTTTCTACCTAGTAATTTATAATTTTAAAGTGTGAGTTTAAAGTATAATTTACCAGGAAAAGGAGCAAGTTTTTAATAAGGAAA  
 AATTTTTCTTTAAATTTCTAATCGTTATGACTAATATAATCAAAAAAATGAAATAAACAAGAGTAAACCTGCTTTAGAGAAATGACTGATAAAAA  
 AAGAAAAATCCTAGATTTACGTACATACATAGCACCTTTAACTACTAAGAAAATATTGAAAGGACTTCCACTTGTGGAGATTATTGTTATGTTGAGTATGC  
 AGACTAGAACATTTAAATTACATAAAGGTAATTTTTGGCGTAATAGATTTTGCCAATGTGATGTTGGCGACTGCTGTAAGGATAGTTAGAAAATATCTAT  
 TCTTATGGAGCATTTAAGAAAAGAAAATAAAGAGTTTATATTTTAACTCTTACAACCTCAAAATGTAAGAAAGTTATGATCTAATTTATCTATTAACAATAT  
 AATAAATCTTTAAAAATTAATGGAGCGTAAGGAAGTAAAGGATATAAAGGTTATATAAAGAAAATTAGAAAGTAACTTACCAAAAGGAAAATACATAA  
 CAAAGGATTTATGAAAAAATAAAAAAGATTATTCAAAAAAAGGACTGAAATGGTATTGAAACCTAATTTGATACCTATAATCCTCATTTCATGTAG  
 TTATTGAGTAAATAAAGTATTTTACAGATAAAAAATTTATATAAATCGAGAAGAGTGGTGGAAATGGAAGTTGCTACTAAGGATGATTCTATAAATC  
 AAGTTGATGTTAGAAAAGCAAAAATTAATGATTATAAAGAGGTTTACGAACTTGCAGAAATTTGCAAGTAAAGACACTGATTATTAATATCGAGGCCAGTATT  
 GAAATTTTTATAAAGCATTAAAGGCAAGCAGGTATTAGTTTTAGTGGATTTTTAAAGATGCACAAAATTTGACAAGCAAGGAAAACCTGATGTTTATAA  
 AAAGAAAGATGAAATTAATATGCTATATAGTTTATAAATGGTGCAAAAAACAAATGAAAAAATAGAAATAGGGAACTTACGGAAGATGAAAAAGA  
 AGAATAAATCAAGATTTAATAGATGAAATAGAAATAGATTAAAGTAACTATACTTTATATATATGATTAAAAAAATAAAAAACAACAGCCTATTAGTT  
 GTGTTTTTATTCTTAAATTTTTAATTTTTAGTTTTAGTTTTAGTTTTAATAAATAGTTTTGCGCTTTTTTCAATTTTTTAAAGAAAGGAGTATTGCA  
 GAATTTGCTTTTTTCTAACAGACTTAGGAAATTTTTAACAGTATCTTCTGCGCGGTGATTTGGAACCTTCAACTTACTAATTTAATAATTTATTTCTTTT  
 TAATTTGACAGTTGCAAAAGAGCTGAACCTGTCTTCAACTAGTTTATCATCTTCAATATAATTTCTGACCTATATAGTATAAATATTTTTATATATTT  
 TTACTTTTTCTGAATCTATTATTTATAATCAAAAAAGTTTTACCACCAAAAAGAAAGTTGACTCTTCTGGTCCAACATTTTTTTACTATATATTCTAAATAA  
 TTTTTGGGAACTGGTGTGAATTTGATTAATCGAACAACAGTTATACTTAAAGGAATTTAACTATAAAAAATATATAGGATTATCTTTTAAATTTCAATTTG  
 GCCTCTTTTTATTAATTTATGTTACCATAAAAGGACATAACGGGAATATGTAGAATTTTTTAATGTAGACAAAATTTACATAAATAAAGAAAGGAAAGT  
 GTTTGTGTTAAATTTATAGCAAACTATCAAAAAATGAGGGGATAAAAAATTTATGAAAAAAGGTTTTCGATGTTATTTTTTAACTTAAATGTTAGGTT  
 TATTACAAATTCGGCCGGCGGAAGCAAACTAAGAGTGTGTTGATGTCAGTATTTAAATTTTGTATAATAGGAATGAAAGTTAAATGATGCTAAAAA  
 TTTGTAATTAAGAAGGAGTATTACATGAACAAAATATAAATATTTCTCAAACTTTTTAACAGGTGAAAAAGTACTCAACCAAAATATAAAACAATGAAT  
 TAAAAGAAAACCGATACCGTTACGAAATTTGAAACAGGTAAGGGCTTAAACGACGAACTGGCTAAAATAAGTAAACAGGTAACGCTATTGAATTAGACA  
 AATTGTTGGGAGTATTCTTACCATTAAAGCACAATAATTTAAAAAGTGGTTTTGAAAGCCTGCTGACATCTACTGATTGTTGAAGAAGGATTCTA  
 CAAGCGTACCTGGATATTCACCGAACACTAGGGTTGCTTGCACACTCAAGTCTCGATTGACGAATGCTTAAAGCTGCCAGCGGAATGCTTTCATCTAAAAC  
 AAAAGTAAACAGTGTCTTAATAAACTTACCAGCCTACACAGATGTTCCAGATAAATATTGGAAGCTATATACGTACTTTGTTCAAATGGGTAACCTGAG  
 GCAGATACCAAAATAGTCTTCTAGTGTAGCGTAGTTAGGCCACCCTCAAGAAGTCTGTAGCACCCTACATCTCGCTGCTAATCTCTGTACCAGT  
 GGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGTCTTACCAGGTTGGAAGTCAAGCAGATAGTTACCGGATAAGGGCGAGCGGTTGGGCTGAACGGGGGTTCTGTGCA  
 CACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACTACACGAACTGAGATACCTACAGCTGAGTATGAGAAAAGCGCCAGCTTCCCGAAGGGGAAAGGCGGACAGG  
 TATCCGTAAGCGGCGAGGTCGGAACAGGAGAGCGCACAGGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCTGTATCTTTATAAGTCTGCTGGGTTTTGCGCCACTCTGA  
 CTTGAGCGTGAATTTTTGTGATGCTGTCAGGGGGCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACGCCGCTTTTTACGGTTCTGGCCTTTTGTGGCCTTTTGC  
 TCACATGTTCTTCTGCTGTTATCCCTGATTTCTGTGGATAACCGTATTACCCTTTGAGTGAAGTATACCGCTCGCCGAGCCGACCGACCGCAGCG  
 AGTCAGTGAAGGAAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGAGGGCCCCCTGCTCGGGGTATTATAGCGATTTTTTGGATATCCATCTTTTTCGACAGATA  
 TACAGGATTTTCCAAAGGTTCTGTAGACTTTCTTGGTGTATCCAACGGCTGAGCGGGCAGGATAGGTGAAGTAAAGCCACCGCGAGCGGGTGTTC  
 CTTCTCACTGCTCTTATTCGCACTGCGGTGCTCAACGGGAATCTGCTGCGAGGCTGGCCGGCTACCGCCGCGTAAACAGATGAGGGCAAGCGGATG  
 GCTGATGAAACCAAGCCAGGAAAGGCGAGCCACCTATCAAGGTGTACTGCTTCCAGACGAAACGAGAGCGATTGAGGAAAAGCGGCGGGCGGCCG  
 CATGAGCCTGTCGGCTACTGCTGGCCGCTGCGCCAGGGCTACAAAATCACGGGCGCTGGACTATGAGCACGCTCCGCGAGCTGGCCCGCATCAATGGCGA  
 CCTGGGCGCCTGGGCGGCTGCTGAACTGCTGCTCACCGACGACCGCGCACGGCGGCTGCGGTGATGTCACGATCTTCCGCTGCTGGCGAAGATCGA  
 AGAGAAGCAGGAGCTGGCAAGGTCATGATGGCGTGTCCGCCGAGGGCAGACCTGACTTTTTAGCCGCTAAAACCGCCGGGGGCGCGCTG  
 ATTTCCAAAGCAGCTCCCATGCGCTCATCAAGAAGAGCGCACTTCGGGAGTGGTGAAGTACATACCAGCAGGAAAGGCAAGCGATCGGGCC

FIG. 13

Seq. ID 24: agrupamento génico de metiltransferase de *C. ljungdahlii*:

ATGAACAGTTTTATTGAAGATGTTGAACAAATTTACAATTTTATAAAAAAATATAGATGTAGAAGAGAAGATGCATTTTAT  
 AGAAACTTATAAGCAAAAATCTAATATGAAGAAAGAAATAGCTTTTCAGAAGAATACTATAAACGAAAAATTATGAATGGA  
 AAAAAATGGAGTAGTGATACTCCTCCGGAAATGGCAGCATTTATGGTTAAAACTTGATAAATGTCAATGATGAATTTGGA  
 ATCCATTTATAAAAAATAGATCCTTCCTGTGGATCTGGGAATTTAATTTGTAAGTGCTTTCTATTTAAATCGAATTTTAT  
 TAAGAATATTGAAGTTATAAATAGTAAAAACAATTTAAATTTGAACTAGAAGATATAAGTTACCATATAGTACGTAAACAATC  
 TATTTGGATTTGATATAGATGAACTGCAATAAAAAGTTTTAAAAATAGACTTATTTTTGATTAGCAATCAGTTTAGTAAAAA  
 ATTTTCAAGTAAAGGATTTCTAGTGGAAAAATATAGATAGAAAAATGATGTGTTTATAGGAAATCCTCCGTATATAGGACAT  
 AAATCTGTAGATTCTAGTTATTCATATGTTTTAAGAAAAATATATGGAAGTATATATAGAGACAAAGGAGACATATCCTACTG  
 TTTTTTCAAAAATCATAAAGTGTTAAAGGAGGGGAGGAAAACTGGTTTTTGTACTTCTAGGTATTTTGTGAATCTTGCAAG  
 CGGAAAAGAAGTAAAGTGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAG  
 AGTAGGTATAGACCAATGATAATTTTTAGTAAGAACAAAAATTTGGAAACAATAATAGAAATCATAAGACCAATAAAA  
 ATTTGAAAAAATGAAAAAATAAATTTCTTGATTCCTGTTTTAGATAAATCTGAAAAATGCAAAAAGTTTTCTATTTCTCAA  
 AAGTCTATAAATAATGATGGATGGGTATTTGTTGACGAAGTTGAGAAAAATATAATAGATAAATAAAGAAAAAGTAAAT  
 TTATTTAAAGGATATATGCCATAGTTGTGAGGGTATAATAACGGGATGTGATAGGGCTTTTATAGTTGATAGAGACATAATA  
 AATAGTAGAAAAATGAATTAAGGTTAATAAAACCCTGGATAAAAAGTAGCCATATACGAAAAACGAAGTAATTAAGGGT  
 AAAAAATTTATTATATACTCAAATTTAATAGAAAATGAAACAGAATGCCTAATGCTATAAAGTATATAGAGCAGTACAAAAA  
 AGGCTTATGGAAAGAAGAGAATGTA AAAAAGGAACAAGAAAGTGGTATGAACTTCAATGGGGGAGAAAACCGGAAATTTT  
 GAAGAAAAGAAAATTTGTTCCCATACAAGTCTGTGACAATAGATTTGCTCTTGACAAGGGAAGCTATTTTAGTGCAGATAT  
 ATATTCCTTAGTATTA AAAAAAATGTACCTTTTACCTATGAAATACTTTTAAATATATTAACAGTCCCTTTGTATGAATTTTACT  
 TTA AAACCTTTGCAAAAAAATAGGAGAAAATCTATATGAGTATTACCCTAATAATCTAATGAAATTTGTGATTCCTTCTATTG  
 ATTTTGGAGGAGAAAATAATAGAAAAAAGCTGTATGATTTTTTTGGACTGACAGATAAGGAAATTTGAGATTGTAGAAAA  
 GATAAAGATAAATTGCTGA

Seq. ID 25: agrupamento génico de metiltransferase de *C. autoethanogenum*:

ATGCATTTTATAGAACTTATAAGCAAAAATCTAATATGAAGAAAGAAATTAGCTTTTCAGAAGAATACTATAAACAGAAAAAT  
 TATGAATGGAAAAAATGGAGTAGTGATACTCCTCCGGAAATGGCAGCATTTATGGTTAAAACTTGATAAATGTCAATGAT  
 GTAATTTGAAATCCATTTATAAAAAATAATAGATCCTTCTGTGGATCTGGGAATTTAATTTGTAAGTGCTTTCTATATTTAAATC  
 GAATATTTATTAAGAATATTGAAGTTATAAATAGTAAAAACAATTTAAATTTGAAACTAGAAGATATAAGTTACCATATAGTAC  
 GTAACAATCTATTTGGATTTGATATAGATGAACTGCAATAAAAAGTTTTAAAAATAGACTTATTTTGGATTAGCAATCAGTTTA  
 GTGAAAAAATTTTCAAGTAAAGGATTTTCTAGTGGAAAAATATAGATAGAAAAATGATGTGTTTATAGGAAATCCTCCGTAT  
 ATAGGACATAAATCTGTAGATTCTAGTTATTCATATGTTTTAAGAAAAATATATGGAAGTATATATAGAGACAAAGGAGACAT  
 ATCCTACTGTTTTTTCAAAAATCATTAAAGTGTTTAAAGGAGGGGAGGAAAACTGGTTTTTGTACTTCTAGGTATTTTGTGA  
 ATCTTGCAGCGGAAAAGAAGTAAAGTGTAAATTTGAAAATACCTCTATTTATAAAATTATAGATTTTATGGTATAAGACC  
 TTTTAAAAGAGTAGGTATAGACCAATGATAATTTTTAGTAAGAACA AAAAATTTGGAACAATAATAGAAATCATAAGAC  
 CCAATAAAATTTGAAAAAATGAAAAAATAAATTTCTTGATTCCTGTTTTTATAGATAAATCTGAAAAATGCAAAAAGTTTTCTA  
 TTTCTCAAAAGTCTATAAATAATGATGGATGGGTATTTGTTGACGAAGTTGAGAAAAATATAATAGATAAATAAAGAAAA  
 AAGTAAATTTATTTAAAGGATATATGCCATAGTTGTGAGGGTATAATAACGGGATGTGATAGGGCTTTTATAGTTGATAGAG  
 ACATAATAAATAGTAGAAAAATTTGAATTAAGGTTAATAAAACCCTGGATAAAAAGTAGCCATATACGAAAAACGAAGTAAT  
 TAAAGGTGAAAAATTTATTATATACTCAAATTTAATAGAAAAATGAAACAGAATGCCTAATGCTATAAAGTATATAGAGCAGT  
 ACAAAAAAAGGCTTATGGAAAGAAGAGAATGTA AAAAAGGAACAAGAAAGTGGTATGAACTTCAATGGGGGAGAAAAC  
 GGAAATTTTGAAGAAAAGAAAATTTGTTCCCATACAAGTCTGTGACAATAGATTTGCTCTTGACAAGGGAAGCTATTTTA  
 GTGCAGATATATTTCTTAGTATTA AAAAAAATGTACCTTTTACCTATGAAATACTTTTAAATATATTAACAGTCCCTTTGTA  
 TGAATTTTACTTTTAAACCTTTGCAAAAAAATTAGGAGAAAATCTATATGAGTATTACCCTAATAATCTAATGAAATTTGTGAT  
 TCCTTCTATTGATTTTGGAGGAGAAAATAATAGAAAAAAGCTGTATGATTTTTTTGGACTGACAGATAAGGAAATTTGAGA  
 TTGTAGAAAAGATAAAGATAAATTGCTGA

FIG. 14



Seq. ID 26: agrupamento gênico de metiltransferase de *C. ragsdalei*:

ATGTTTCCCTGTAATGCATATATTCAGCACGGAGATAGGAATATGAATAATTTTATTGAAGATATTGAAGAAATTTATAATTTT  
 ATTAATAAAAAATACAGATGTAGAAGAGAATATTCATTTTATAGAACTTATAGGCAAAGACTTAATATGAAGAAAGAAATTA  
 GCTTTTCAGAAGAATACTATAAACAGAAAATTATGAATGGAAAAACGGAGTAGTGATACTCCTCCGAAATGGCAGCATT  
 TATGGTTAAAAACTGATAAATGTCAATGATGAATTTGAAAAATCCATTTATAAAAGTAGTAGATCCTTCTGTGGATCTGGAA  
 ATTTAATTTGTAAGTGCTTTCTATACTTAAATCAAATATTCATTAATAATTTGAAGTTATAAATAGTAAAAATAATTTAAATTT  
 GAACTAAAAGATATAAGTTACCATATAGTACATAACAATCTATTTGGATTTGATGTAGATGAACTGCAATAAAAAGTTTAA  
 AATAGACTTATTTTGTATTAGCAATCAGTTTAGTGAATAAATTTCAAGTAAAGGATTTTCTAGTGGAAAATATAGATAGAA  
 AATTTGATGTGTTTATAGGAAATCCCATATATAGGACATAAATCTGTAGATTCCAGTTATTCATATATTTTAAAGAAAATAT  
 ATGGAAGTATATAGAGATAAAGGAGACATATCTACTGTTTTTTTCAAAAATCATTAAAGTGCTTAAAGAGGGGAGGAA  
 ATTACTTTTTGTTACCTCCAGATATTTTTCGAATCTTGCAGCGGAAAAGAACTTAGAAAAGTTTTAATTGAAAATACCTCTATT  
 TATAAAATTATAGATTTTATGGTATAAGACCTTTTAAAAGAGTAGGTATAGATCCAATGATAATTTTTAGTAAGAACAAA  
 AATTGGGACAATAATATAGAAATCATAAGACCAATAAAAGTGGAAAAGATGAAAAAATAAATTCCTTGATCTTTGCTTTT  
 AGATAAATCTGAAAAATACAAAAATTTTCTATTCCTCAAAAGTCTATAAATAGTGATGGATGGGTATTTGTTAATGAAGTTG  
 AGAAAAATATAATGGATAAAATAGAAGCAAAAAGTGAATTTATTTTAAAGGATATATGCCATAGTTATCAGGGTATAATAAC  
 GGGATGTGATAGGGCTTTTATAGTTGATAGAGACACAATAAATAGTAGAAAAATTGAATTAAGGTTAATAAAAACCTGGGTG  
 AAAAGCAGCCATATACGAAAAACGAAGTAATTAAGGTGAAAAATTTATTATATACTCAAATTTAATAGAAAATGAGATAG  
 AATGTCCTAATGCTATAAAGTATATAGAGCAGTACAAAAAAGCTTATGGAAAGAAGAGAATGTA AAAAGGAACGAGAA  
 AGTGGTATGAGCTTCAATGGGGGAGAAAACCGGAAATTTTCAAGAAAAGAAAATTGTATCCCATACAAATCGTGTGATAA  
 TAGATTTGCTCTTGATAAGGGAAGCTATTTTAGTGCAGATATATATTCTTTAGTATTA AAAAAAATGTACCTTTTACCTATGA  
 AATGCTTTTAAATATATTAATAGTTCTTTGTATGAATTTACTTTAAAACCTTTCGGGAAAAAATTAGGAGAAAATCTATATGA  
 GTATTATCCTAATAATCTGATGAAATGTGTATTCCTTCTATTGTTTTCGAGAAGAAAATAATGTAGAAAAAAGGTTGTATGA  
 TTTTTGGGCTGACAGATAAGGAAATTCAGATTGTAGAAAAAATAAAGATAATTGCTGA

FIG. 15

Seq. ID 27: sequência de nucleotídeos de novo gene de metiltransferase fundido com um promotor *lac* induzível:

GCGGCCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTT  
 GTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACACATATGTTCCGTGCAATGCCTATATCGAATATGGTGATAAA  
 AATATGAACAGCTTTATCGAAGATGTGGAACAGATCTACAATTCATTA AAAAGAACATTGATGTGGAAGAAAAGATGCATT  
 TCATTGAACTATAAACAGAAAAGCAACATGAAGAAAGAGATTAGCTTTAGCGAAGAATACTATAAACAGAAAGATTATGAA  
 CGGCAAAAATGGCGTTGTGTACACCCCGCGGAAATGGCGCCTTTATGGTTAAAAATCTGATCAACGTTAACGATGTTATTG  
 GCAATCCGTTTATTA AAAATCATTGACCCGAGCTGCGGTAGCGGCAATCTGATTTGCAAATGTTTTCTGTATCTGAATCGCATCT  
 TTATTAAGAACATTGAGGTGATTAACAGCAAAAATAACCTGAATCTGAAACTGGAAGACATCAGCTACCACATCGTTTCGCAAC  
 AATCTGTTTGGCTTCGATATTGACGAAACCGGATCAAAGTGTGAAAATTGATCTGTTTCTGATCAGCAACCAATTTAGCGA  
 GAAAAATTTCCAGGTTAAAGACTTTCTGGTGGAAAATATTGATCGCAAATATGACGTGTTTATTGGTAATCCGCCGTATATCG  
 GTCACAAAAGCGTGGACAGCAGCTACAGCTACGTGCTGCGCAAATCTACGGCAGCATCTACCGCGACAAAAGCGGATATCA  
 GCTATTGTTCTTTAGAAAGCCTGAAATGTCTGAAGGAAGGTGGCAAATGTTGTTGACCGAGCCGCTACTTCTGCGA  
 GAGCTGACGCGTAAAGAAGTAAATCCTGATCGAAAACAGCAGCATTACAAAGATCATTGATTTTACGGCATCCGCC  
 CGTTCAAACGCGTGGGTATCGATCCGATGATTTTCTGTTTCTGTTTCTGACGAAAGAACTGGAACAATAACATTGAAATATTCCG  
 CCGAACAAGATTGAAAAGAAGCAAAAAGAAACAATTCCTGGATAGCCTGTTCTGGACAAAAGCGAAAAGTGTAAAAAGTTT  
 AGCATTAGCCAGAAAAGCATTAAATACGATGGCTGGGTTTTCTGGACGAAGTGGAGAAAAACATTATCGACAAAATCAA  
 GAGAAAAGCAAGTTTATTCTGAAAGATATTTGCCATAGCTGTCAAGGCATTATCACCGGTTGTGATCGCGCCTTTATTGTGGA  
 CCGTGATATCATCAATAGCCGTAAGATCGAACTGCGTCTGATTA AACCGTGGATTAAAAGCAGCCATATCCGTAAGAATGAA  
 GTTATTAAGGGCGAAAAATTCATCATCTATAGCAACCTGATTGAGAATGAAACCGAGTGTCCGAATGCGATTAAATATATCGA  
 ACAGTACAAGAAACGCTGATGGAGCGCCGGAATGCAAAAAGGGCACGCGTAAGTGGTATGAACTGCAATGGGGCCGTA  
 AACCGGAAATCTCGAAGAAAAGAAAATTTTTCCCGTATAAAAGCTGTGACAATCGTTTTGCACTGGATAAGGGTAGCTAT  
 TTTAGCGCAGACATTTATAGCCTGTTCTGAAGAAAATGTGCCGTTACCTATGAGATCCTGCTGAATATCCTGAATAGCCC  
 GCTGTACGAGTTTTACTTTAAGACCTTCGCGAAAAGCTGGCGGAGAATCTGTACGAGTACTATCCGAACAACCTGATGAAG  
 CTGTGATCCCGAGCATCGATTTCCGGCGGTGAGAAACAATTTGAGAAAAGCTGTATGATTTCTTTGGTCTGACGGATAAAG  
 AAATTGAGATTGTGGAGAAGATCAAAGATAACTGCTAAGAATTC

FIG. 16

Seq. ID 28: sequência de proteína da nova metiltransferase:

MFPKNAYIEYDKNMNSFIEDVEQIYNFIKKNIDVEEKMHFIEYKQKSNMKKEISFSEEYKQKIMNGKNGVVYTPPEMAAFMVK  
 NLINVNDVIGNPFKIIDPSCGSGNLICKFLYLNRIFIKNIEVINSKNNLNLKLEDISYHIVRNNLFGFDIDETAIKVLKIDLFLISNQFSEK  
 NFQVKDFLVENIDRKYDVFIGNPPYIGHKSVDSYSYVLRKIYGSYRDKGDISYCFQKSLKCLKEGGKLVFVTSRYFCESCSGKELRKF  
 LIENTSIYKIIDFYGIRPFKRVGIDPMIIFLVRTKNWNNNIEIHRPNKIEKNEKNFLDSLFLDKSEKCKKFSISQKINNDGWVVFVDEVEK  
 NIIDKIKEKSKFILKDICHSCQGIITGCDRAFIVDRDIINSRKiELRLIKPWIKSSHIRKNEVIKGEKFIHYSNLIENETPCNAIKYIEQYKRL  
 MERRECKKGRKWLQWGRKPEIFEKIVFPYKSCDNRFALDKGSYFSADIYSLVLKKNVPFTEILLNLSPLYEFYFKTFAKKLG  
 ENLYEYPPNMLKLCIPSIDFGGENNIEKKLYDFGLTDKEIEIVEKIKDNC\*

FIG. 17

Seq. ID 29: Plasmídeo pGS20:

TTTGCCACCTGACGTCTAAGAAAAGGAATATTAGCAATTTGCCCGTGCCGAAAGAAAGGCCACCCGTGAAGGTGAGCCAGT  
 GAGTTGATTGCTACGTAATTAGTTAGTTAGCCCTTAGTGACTCGTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGTCTAGAGAATTG  
 ATATCACCCGGAACTAGTCTGCAGCCCTTAGTGAGGGTTAATTGGAGTCACTAAGGGTTAGTTAGTTAGATTAGCAGAAA  
 GTCAAAAGCCTCCGACCGGAGGCTTTGACTAAAACCTCCCTTGGGGTTATCATTGGGGCTCACTCAAAGCGGTAATCAGAT  
 AAAAAAATCCTTAGCTTCGCTAAGGATGATTTCTGCTAGAGATGGAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGAC  
 CACTTCTGCGCTCGGCCCTCCGGCTGGCTGGTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATT  
 GCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAAGCAACTATGGATGAACGA  
 AATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTGAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGAT  
 TGATTTAAAACCTCATTTTTAAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTGTATAATCTCATGACCAAAATCCCTAACGTGA  
 GTTTTCTTCCACTGAGCGTCAGACCCCTTAATAAGATGATCTTCTGAGATCGTTTTGGTCTGCGCGTAATCTCTGCTCTGA  
 AAACGAAAAACCGCCTTGCAAGGGCGGTTTTCGAAGGTTCTCTGAGCTACCAACTCTTGAACCGAGGTAACCTGGCTTGA  
 GGAGCGCAGTCACCAAACTTGCTCTTTCAGTTTTCAGCTTAAACCGCGCATGACTTCAAGACTAACTCCTCTAAATCAATTACC  
 AGTGGCTGCTGCCAGTGGTCTTTGTCATGTCTTCCGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTG  
 GACTGAACGGGGGTTCTGTCATACAGTCCAGCTTGGAGCGAACTGCCTACCCGGAAGTGTGAGTGTGAGGCGTGAATGAGA  
 CAAACGCGCCATAACAGCGGAATGACACCGGTAACCGAAAGGCAGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCCGCCAGGG  
 GAAACGCTGTATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTCCGCCACTGATTTGAGCGTCAGATTTCTGATGCTTGTGAGGGGG  
 CGGAGCCTATGAAAAACGGCTTTCGCCGCGCCCTCTCACTCCCTGTTAAGTATCTTCTGCGCATCTCCAGGAAATCTCCGC  
 CCCGTTCTGAAGCCATTTCCGCTCGCCGAGTCGAACGACCGAGCGTAGCGAGTCACTGAGCGAGGAAGCGGAATATATCCT  
 GTATACATATTCTGCTGACGACCGGTGCAGCCTTTTCTCTGCCACATGAAGCACTTCACTGACCCCTCATCAGTGCCA  
 ACATAGTAAGCCAGTATACACTCCGCTAGCGCTGAGGTCTGCCTCGTGAAGAAGGTGTTGCTGACTCATACCAGGCTGAAT  
 CGCCCATCATCCAGCCAGAAAGTGAGGGAGCCACGGTTGATGAGAGCTTTGTTGAGGTGGACCAGTTGGTGATTTTGAAC  
 TTTTCTTGGCCAGGAACGGTCTGCGTTGTCGGGAAGATGCGTGATCTGATCCTCAACTCAGCAAAAGTTTCGATTTATTCA  
 ACAAGCCACGTTGTGTCTCAAAATCTGTGATGTTACATTGCACAAGATAAAAAATATATCATCATGAACAATAAACTGTCTGC  
 TTACATAAACAGTAATACAAGGGGTGTTACTAGAGGTTGATCGGGCACGTAAGAGGTTCCAACCTTCCACATAATGAAATA  
 AGATCACTACCGGGCGTATTTTTGAGTTATCGAGATTTTCAGGAGCTAAGGAAGCTAAAATGGAGAAAAAATCACGGGAT  
 ATACCACCGTTGATATATCCCAATGGCATCGTAAAGAACATTTGAGGCATTTCAAGTCAATGCTCAATGTACCTATAACCGA  
 CCGTTCAGCTGGATATTACGGCCTTTTTAAAGACCGTAAAGAAAAAATAAGCACAAAGTTTTATCCGGCCTTTATTCACATTTCTG  
 TTACACCGTTTTCCATGAGCAAACGTAACGTTTTCGCTCCTCTGGAGTGAATACCAGACGATTTCCGGCAGTTTCTCCACAT  
 ATATTCGAAGATGTGGCGTGTACGGTGAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGTTTATTGAGAATATGTTTTTGTCTCAGC  
 CAATCCCTGGGTGAGTTTACCAGTTTGTATTAACGTTGGCAATATGGACAACCTTCTCGCCCCGTTTTTACGATGGGCAA  
 ATATTTATACGCAAGGGCACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATCCAGGTTTATCATGCGGTTTTGATGGCTTCCATGTCCGGC  
 GCATGCTAATGAATTAACAGTACTGTGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTAATAATACTAGCTCCGGCAAAAAACGGGC  
 AAGGTGTACCACCTGCCCTTTTTCTTAAAACCGAAAAGATTACTTCGCG

FIG. 18

Seq. ID 30: Gene de rRNA 16s de *C. autoethanogenum* (Y18178; GI: 7271109):

GGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGATGAAGCTCCTTCGGGAGTGGATTAGCGGCGGA  
CGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCTCAAAGAGGGGGATAGCCTCCCGAAAGGGAGATTAATACCGCATAATAATCAG  
TTTTACATGGAGACTGATTTAAAGGAGTAATCCGCTTTGAGATGGACCCGGCGCATTAGCTAGTTGGTAGGGTAACGGC  
CTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGAACTGAGAGACGGTCCAGACTCCTACGGG  
AGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATTGT  
AAAGCTCTGCTTTGGGGACGATAATGACGGTACCCAAGGAGGAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATA  
CGTAGGTGGCGAGCGTTGCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGTGCGTAGGCGGATATTTAAGTGAGATGTGAAATACCCGG  
GCTTAACCCGGGCACTGCATTTCAAACCTGGATATCTAGAGTGCGGGAGAGGAGAATGGAATCCTAGTGTAGCGGTGAAAT  
GCGTAGAGATTAGGAAGAACACCAAGTGGCGAAGGCGATTCTCTGGACCGTAACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGTA  
GCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTACTAGGTGTAGGAGGTATCGACCCCTCTGTGCCG  
CAGTAAACACAATAAGTACTCCGCCTGGGAAGTACGATCGCAAGATTTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCCGACAAG  
CAGCGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCTGGACTTGACATACCCTGAATATCTTAGAGATAAGA  
GAAGCCCTTCGGGGCAGGGATACAGGTGGTGATGGTTGTCGTACGCTCGTGTGAGATGTTAGGTTAAGTCTGCAAC  
GAGCGCAACCCTGTTGTTAGTTGCTAACATTTAGTTGAGCACTCTAGCAAGACTGCCGCGGTTAACGCGGAGGAAGGTGGG  
GATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCAACACAGTGTACAATGGGCAGTACAGAGAGAAGCAAGACCGCA  
AGGTGGAGCAAACCTCAAAAACCTGCCCCAGTTCGGATTGCAGGCTGAAACTCGCCTACATGAAGTTGGAGTTGCTAGTAAT  
CGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCGTCACACCATGAGAGCTGGCAACACCCGA  
AGTCCGTAGTCTAACTTAGGAGGACGCGGCCGAAGGTGGGGTTAGTAATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGT

FIG. 19

Seq. ID 31: Plasmídeo de expressão de butanol pMTL85245-thlA-crt-hbd:

ATAAAAAATTGTAGATAAATTTTATAAAATAGTTTTATCTACAATTTTTTATCAGGAAACAGCTATGACCGCGGCCG  
AATATGATATTTATGTCATTGTGAAAGGGATTATATCAACTATTATCCAGTTACGTTTCATAGAAAATTTTCCTTTCTA  
AAATATTTTATCCATGTCAAGAACTCTGTTTTTTCATTAAAGAACTATAAGTACAAAGTATAAGGCATTTGAAAAAT  
AGGCTAGTATATTGATTGATTTATTTTAAAAATGCCTAAGTAAATATACATATTATAACAATAAAATAAGTATTA  
GTGTAGGATTTTTAAATAGAGTATCTATTTTCAGATTAATTTTTGATTATTTGATTTACATTATATAAATATTGAGTAAA  
GTATTGACTAGCAAAATTTTTGATACTTTAATTTGTGAAATTTCTTATCAAAAGTTATATTTTTGAATAATTTTTATTG  
AAAAATACAATAAAAGGATTATAGTATAAGTGTGTGTAATTTTGTGTTAAATTTAAAGGGAGGAAATGAACATGAAAC  
ATATGAAAGAAGTTGTAATAGCTAGTGCAGTAAGAACAGCGATTGGATCTTATGGAAAGTCTCTTAAGGATGTACCAGCA  
GTAGATTTAGGAGCTACAGCTATAAAGGAAGCAGTTAAAAAGCAGGAATAAAACCAGAGGATGTTAATGAAGTCATTTT  
AGGAAATGTTCTTCAAGCAGGTTTAGGACAGAATCCAGCAAGCAGGCATCTTTTAAAGCAGGATTACCAGTTGAAATTC  
CAGCTATGACTATTAATAAGGTTTGTGGTTTCCAGGACTTAGAACAGTTAGCTTAGCAGCACAAATATAAAAGCAGGAGAT  
GCTGACGTAATAATAGCAGGTTGATGAAAATATGTCTAGAGCTCCTTACTTAGCGAATAACGCTAGATGGGGATATAG  
AATGGGAAACGCTAAATTTGTTGATGAAATGATCACTGACGGATTGTGGGATGCATTTAATGATTACCACATGGGAATAA  
CAGCAGAAAACATAGCTGAGAGATGGAACATTTCAAGAGAAGAACAAGATGAGTTTGTCTTGCATCACAAAAAAGCT  
GAAGAAGCTATAAAATCAGGTCAATTTAAAGATGAAATAGTTCCTGTAGTAATTAAGGCAGAAAGGGAGAACTGTAGT  
TGATACAGATGAGCACCTAGATTTGGATCAACTATAGAAGGACTTGCAAAATTAACCTGCCTTCAAAAAAGATGGAA  
CAGTTACAGCTGATGATGCATCAGGATTAATGACTGTGCAGCAGTACTTGAATCATGAGTGCAGAAAAAGCTAAAGAG  
CTTGGAGTAAACCACTTGTCTAAGATAGTTTCTTATGGTTTCCAGGAGTTGACCCAGCAATAATGGGATATGGACCTTT  
CTATGCAACAAAAGCAGCTATTGAAAAGCAGGTTGGACAGTTGATGAATTAAGATTAAATAGAAATCAATGAAGCTTTTG  
CAGCTCAAAAGTTAGCAGTAGCAAAAGATTTAAATTTGATATGAATAAAGTAAATGTAATGGAGGAGCTATTGCCCTT  
GGTCATCAATTTGGAGCATCAGGTGCAAGAATACTCGTTACTCTTGTACAGCAATGCAAAAAAGAGATGCAAAAAAAGG  
CTTAGCAACTTTATGTATAGGTTGGCGGACAAGGAACAGCAATATTGCTAGAAAAAGTGCTAGGAATTCGAGCTCGGTACCT  
TAGGAGGATTAGTCATGGAATAAACAATGTCATCCTTGAAGGAAGGTAAGTTGCTGTAGTTACCATTACAGACCT  
AAAGCATTAAATGCGTTAAATAGTGATACACTAAAAGAAATGGATTATGTTATAGGTGAAATGAAATGATAGCGAAGT  
ACTTGCAGTAATTTAACTGGAGCAGGAGAAAAATCATTGTAGCAGGAGCAGATATTTCTGAGATGAAGGAAATGAATA  
CCATTGAAGGTAGAAAATTCGGGATACTTGGAAATAAAGTGTTTAGAAGATTAGAATCTTGGAAAAGCCTGTAATAGCA  
GCTGTTAATGGTTTTGCTTTAGGAGGCGGATGCGAAATAGCTATGTCTTGTGATATAAGAATAGCTTCAAGCAACGCAAG  
ATTTGGTCAACCGAAGTAGGTTCTCGGAATAACACCTGGTTTTGGTGGTACACAAGACTTTCAAGATTAGTTGGAAATGG  
GCATGGCAAAGCAGCTTATATTTACTGCACAAAATATAAAGGCAGATGAAGCATTAAAGAAATCGGACTTGTAAATAAGGTA  
GTAGAACCTAGTGAATTAATGAATACAGCAAAAGAAATTGCAACAAAATTTGTGAGCAATGCTCCAGTAGCTGTTAAGTT  
AAGCAACAGGCTATTAATAGAGGAATGCAGTGTGATATTGATACTGCTTTAGCATTGAAATCAGAAGCATTGGAGAAT  
GCTTTTCAACAGAGGATCAAAAGGATGCAATGACAGCTTTCATAGAGAAAAAGAAAAATGAAGGCTTCAAAAAATAGATAG  
AGGTTAAGTTTATATGGATTTAATTTAACAAGAGAACAAGAATTAGTAAGACAGATGGTTAGAGAATTTGCTGAAATG  
AAGTTAAACCTATAGCAGCAGAAATGATGAAACAGAAAGATTTCCAATGGAAATGTAAGAAATGGGTGATGATGGT  
ATGATGGGAATCCATTTTCAAAAGATGATGGTGGCGCAGGTGGAGATGATTTATCTTATATAATCGCCGTTGAGGAAT  
ATCAAAAGTTTGGGTACTACAGGAGTTATCTTTCAGCACATACATCACTTTGTGCTTCAATTAATAAATGAACATGGTA  
CAGAAGAACAAAAACAAAAATTTTATGACCTTTAGCTAAAGGTGAAAAAATAGGTTGCTTATGGATTGACTGAGCCAAAT  
GCAGGAACAGATTCTGGAGCACAACAACAGTAGCTGTACTTGAAGGAGATCATTATGTAATTAATGGTTCAAAAAATATT  
CATAACTAATGGAGGAGTTGAGATACTTTTGTATATTTGCAATGACTGACAGAACTAAAGGAACAAAAGGTATATCAG  
CATTTATAATAGAAAAGGCTTCAAGGTTTCTCTATTGGTAAAGTTGAACAAAAGCTTGAATAAGAGCTTCATCAACA  
ACTGAACTTGTATTGAAGATATGATAGTACCAGTGAAGAAACATGATTGGTAAAGAAAGGAAAAAGGCTTCCCTATAGCAAT  
GAAAACCTTGTATGGAGGAAGAATTGGTATAGCAGCTCAAGCTTATAGGTATAGCTGAAGGTTGCTTCAACGAAGCAAGAG  
CTTACATGAAGGAGAGAAAACAATTTGGAAGAAGCCTTGACAATTCAGGCTTGCATGGATGATGGCAGATATGGAT  
GTAGCTATAGAATCAGCTAGATATTTAGTATATAAAGCAGCATATCTTAAACAAGCAGGACTTCCATACACAGTTGATGC  
TGCAAGAGCTAAGCTTATGCTGCAATGTAGCAATGGATGTAACAATAAGGCAGTACAATTTTGGTGGATACCGGAT  
ATACAAAAGATTATCCAGTTGAAAGAATGATGAGAGATGCTAAGATAACTGAAATATATGAAGAACTTCAGAAGTTCCAG  
AAATTAGTTATTTTCAAGAAAAATTTTTAGATAATTTAAGGAGTTAAGAGGATGAATATAGTTGTTTAAAAACAAGT  
TCCAGATACAGCGGAAGTTAGAATAGATCCAGTTAAGGGAACACTTATAAGAGAAGGAGTTCCATCAATAAATAATCCAG  
ATGATAAAAAACGCACTTGGAGGAGCTTTAGTATTAAGATAATTTATGGTGACATGTAACAGTTATAAGTATGGGACCT  
CCACAAGCTAAAAATGCTTATGTAAGCTTTGGCTATGGGTGCTGATGAAGCTGACTTTTAAACAGATAGAGCATTGG  
AGGAGCAGATACACTTGCAGCTTACATACAATTTGCAGCAGGAATTAAGAAGCTTAAATATGATATAGTTTTGCTGGAA  
GGCAGGCTATAGATTGGAGATACAGCTCAGGTTGGACCAGAAATAGCTGAGCATCTTGAATACCTCAAGTAACTTATGTT  
GAGAAAAGTTGAAGTTGATGGAGATACTTTAAAGATTAGAAAAGCTTGGGAAAGATGGATATGAAGTTGTTGAAGTTAAGC  
ACCAGTTCTTTTAAACAGCAATTAAGAATTAATGTTTCAAGATATATGAGTGTAGAAAAAATTTCCGGAGCATTGATA  
AAGAAGTAAAAATGTGGACTGCCGATGATATAGATGATAGATAAGGCTAATTTAGTCTTAAAGGTTCCCAACTAAAGTT  
AAGAAGTCACTCAACTAAAGAAGTTAAAGGACAGGGAGAAGTTATTGATAAGCCTGTTAAGGAAGCAGCTGCATATGTTGT  
CTCAAAATTAAGAAGAACAACACTATATTTAAGTTAGGAGGATTTTTCAATGAATAAAGCAGATTACAAGGGCGTATGGG  
TGTTTGTGTAACAAGAGACGGAGAATTACAAAAGGTATCATTGGAATTTAGGTAAGGTAAGGAAATGCTGAGAA  
TTAGGCGTTGAATTAACAGCTGTTTTACTTGGACATAACTGAAAAATGTCAAAGGATTTATTATCTCATGGAGCAGA  
TAAGGTTTTAGCAGCAGATAATGAACTTTTAGCACATTTTTCAACAGATGGATATGCTAAAGTTATATGTGATTTAGTTA

Figura 20 (sequência continua na Figura 21)

FIG. 20

ATGAAAGAAAGCCAGAATATTATTCATAGGAGCTACTTTTCATAGGAAAGAGATTTAGGACCAAGAATAGCAGCAAGACTT  
 TCTACTGGTTTAACTGCTGATTGTACATCACTTGACATAGATGTAGAAAATAGAGATTTATTGGCTACAAGACCAGCGTT  
 TGGTGGAAATTTGATAGCTACAATAGTTTGTTCAGACCACAGACCACAAATGGCTACAGTAAGACCTGGTGTGTTGAAA  
 AATTACCTGTTAATGATGCAAATGTTTCTGATGATAAAATAGAAAAAGTTGCAATTAATTAACAGCATCAGACATAAGA  
 ACAAAGTTTCAAAGTTGTTAAGCTTGCTAAAGATATTGCAGATATCGGAGAAGCTAAGGTATTAGTTGCTGGTGGTAG  
 AGGAGTTGGAAGCAAAGAAAACCTTTGAAAACTTGAAGAGTTAGCAAGTTACTTGGTGGAAACAATAGCCGCTCAAGAG  
 CAGCAATAGAAAAAGAAATGGGTTGATAAGGACCTTCAAGTAGGTCAAACTGGTAAAACTGTAAGACCAACTCTTTATATT  
 GCATGTGGTATATCAGGAGCTATCCAGCATTAGCAGGTATGCAAGATTGAGTTACATAAATTGCTATAAATAAAGATGT  
 AGAAGCCCCAATAATGAAGGTAGCAGATTTGGCTATAGTTGGTGTATGAAATAAAGTTGTACCAGAATTAATAGCTCAAG  
 TTAAGCTGCTAATAATTAAGATAAATAAAAAAGAAATTTTAAAGCTTATTATGCCAAAATCTTATATAGTATTTGGT  
 GTAAATGCATTGATAGTTTCTTAAATTTAGGGAGGTCTGTTTAAATGAAAAAGGTATGTTTATAGGTGCAGGTACTATG  
 GGTTCCAGGAATTGCTCAGGCATTTGCAGCTAAAGGATTGAAGTAGTATTAAGAGATATTAAGATGAATTTGTTGATAG  
 AGGATTAGATTTTATCAATAAAAACTTTCTAAATTAGTTAAAAAAGGAAAGATAGAAGAAGCTACTAAAGTTGAAATCT  
 TAACTAGAATTTCCGGAACAGTTGACCTTAATATGGCAGCTGATTGCGATTTAGTTATAGAAGCAGCTGTTGAAAGAATG  
 GATATTAAGAAAGCAGATTTTGTGACTTAGACAATATATGCAAGCCAGAAACAATTTCTGCATCAAATACATCATCACT  
 TTCAATAACAGAAGTGGCATCAGCAACTAAAAGACCTGATAAGGTTATAGGTATGCATTTCTTAAATCCAGCTCCTGTTA  
 TGAAGCTTGTAGAGGTAATAAGAGGAATAGCTACATCACAAAGAACTTTTGTGCAGTTAAAGAGACATCTATAGCAATA  
 GGAAGATCCTGTAGAAGTAGCAGAAGCAGCAGGATTTGTTGTAATAGAATATTAATACCAATGATTAATGAAGCAGT  
 TGGTATATTAGCAGAAGGAATAGCTTCACTAGAGAAGACATAGATAAAGCTATGAAACTTGGAGCTAATCAGCAATGGGAC  
 CATTAGAATTAGGTGATTTTATAGGTCTGATATATGCTTGTATAATGGATGTTTATACTCAGAACTGGAGATTCT  
 AAGTATAGACCACATACATTACTTAAGAAGTATGTAAGAGCAGGATGGCTTGGAAAGAAATCAGGAAAGGTTTCTACGA  
 TTATTCAAAATAAGTTTACAAGAATCCGGATCCTTAGAGTTCGACGTCACGCGTCCATGGAGATCTCGAGGCCTGCAGAC  
 ATGCAAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTCGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAATTAATCGCCTTGCA  
 GCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCCGACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCTGAA  
 TGCGCAATGGCGCTAGCATAAAAAAAGAAGCCTGCATTTGCAGGCTTCTATTTTTATGGCGCGCCGATTCACCTCTT  
 TTCTATAAATATGAGCGAAGCGAATAAGCGTCGGAAAAGCAGCAAAAAGTTTCTTTTTGCTGTGGAGCATGGGGT  
 TCAGGGGTGTCAGTATCTGACGTCATGCGGAGCGAAAGCGAGCCGAAGGGTAGCATTACGTTAGATAACCCCTGATA  
 TGCTCCGACGCTTATATAGAAAAGAAGATCAACTAGGTAATAATCTAATATAGGTTGAGATGATAAGGTTTAAAGGA  
 ATTTGTTGTTCTAATTTTCACTCATTTGTTCTAATTTCTTTTAAACAATGTTCTTTTTTTTTAGAACAGTTATGAT  
 ATAGTTAGAATAGTTTAAATAAGGAGTGAGAAAAGATGAAAAGAAAGATATGGAACAGTCTATAAAGGCTCTCAGAGGC  
 TCATAGACGAAGAAAGTGGAGAAGTATAGAGGTAGACAAGTTATACCGTAAACAACGCTGGTAACTTCGTAAGGCA  
 TATATAGTGAATTAATAAGTATGTTAGATATGATTGGCGGAAAAAACTTAAATCGTTAACTATATCCTAGATAATGT  
 CCACTAAGTAAACAATCAATGATAGCTACAACAAGAGAAATAGCAAAAGCTACAGGAACAAGTCTACAAACAGTAATAA  
 CAACACTTAAATCTTAGAAGAAGGAAATATTATAAAAAAGAAAACTGGAGTATTAATGTTAAACCTGAACACTAATG  
 AGAGCGCAGCAAAAAACAAAATACCTCTTACTCGAATTTGGGAACTTTGAGCAAGAGGCAAATGAAATAGATTGACC  
 TCCAATAACACCAGTATGTTATTGGGAGGTCAATCTATGAAATGCGATTAAGGGCCGCGAAGCAAACCTAAGAGTGT  
 GTTGATAGTGCAGTATCTAAAATTTGTATAATAGGAATGAAGTTAAATAGATGCTAAAAATTTGTAATTAAGAGG  
 AGTGATTACATGAACAAAATATAAATATTCTCAAACTTTTTAACGAGTGAAAAAGTACTCAACCAATAATAAAAA  
 ATTGAATTTAAAGAAACCGATACCGTTTACGAAATTTGGAACAGGTAAGGGCATTAAACGACGAACTGGCTAAAATAA  
 GTAAACAGGTAACGCTATTGAATTAGACAGTCTATTCAACTATCGTCAGAAAAATTAACACTGAATCTCGTGC  
 ACTTTAATTCACCAAGATATTCTACAGTTTCAATTCCTAACAAACAGAGGTATAAATTTGGGAGTATTCCTACCA  
 TTTAAGCACACAAATTAATAAAAAAGTGGTTTTGAAAGCCATGCGCTGACATCTATCTGATTGTTGAAGAAGGATTCT  
 ACAAGCGTACCTTGGATATTCACCGAACACTAGGGTGTCTCTTGCACACTCAAGTCTCGATTGAGCAATTGCTTAAGCTG  
 CCAGCGAATGCTTTTATCCTAAACCAAAAGTAAACAGTGTCTTAATAAAACTTACCCGCCATACCACAGATGTTCCAGA  
 TAAATTTGGAAGCTATATACGTACTTTGTTTCAAATGGGTCAATCGAGAATATCGTCAACTGTTTACTAAAAATCAGT  
 TTCATCAAGCAATGAAACACGCCAAAGTAAACAATTAAGTACCGTTACTTATGAGCAAGTATTGTCTATTTTTAATAGT  
 TATCTATTTTAAACGGGAGGAAATAATCTATGAGTACGCTTTTGTAAATTTGGAAAGTTACACGTTACTAAAGGGAATG  
 TGTTTAACTCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTAACGTCGATTTTCTGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTA  
 GAAAAGATCAAAGGATCTTCTGAGATCCTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTGCAAAACAAAAAAACCACCGTACC  
 AGCGGTGGTTTGTGGCCGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCCAGCAGAGCGCAGATACCAA  
 ATACTGTTCTTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCCCTACATACCTCGCTCTGCTA  
 ATCCTGTACCAAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGTCTTACCAGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCCGATAA  
 GGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGTTTCTGTCACACAGCCAGCTTGGAGCGAAGCAGCTACACCGAACTGAGATACC  
 TACAGCGTGAAGTATGAGAAAGCGCCAGCTTCCGAAGGGAGAAAGGGCGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTGGGA  
 ACAGGAGAGCGCAGGAGGAGCTTCCAGGGGGAACCGCTGTATCTTTATAGTCTGTCGGGTTTCCGCCACTCTGACT  
 TGAGCGTGCATTTTGTGATGCTGTCAGGGGGGGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACGCGGCTTTTTACGGTTCC  
 TGGCCTTTTGTGCTGCTTTTGTCTACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCTTT  
 GAGTGAGCTGATACCGCTGCGCCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAAGTGAAGCGGGAAGCGGGAAGCGCCCAAT  
 ACGCAGGGCCCCCTGCAGG

FIG. 21

Seq. 39: sequência de nucleotídeos de desidrogenase de butanol/butiraldeído bifuncional de *C. autoethanogenum*:

ATGAGAAATTTGTTTATATTTAACAGCATAAAAAATAAGAAAGAGGTGTCATTAATGAAGGTAACCTAAGGTAACCTAAGGTAACCTGTTG  
 AAGAATTAATGAAAAAGTTAGATGAAGTAACGGCTGCTCAAAGAAATTTCTAGCTATACTCAAGAACAAGTGGATGAAAT  
 TTTAGGCAAGGCTAGTGGCAGCCAATAGTCTAGAATAGACTTAGCTAAAATGGCAGTGAAGAAAGCGGAATGGGAAT  
 TGTAAGACAAGGTCATTAATAATCATTTTGTTCAGAAATATATATAACAAATATAAGGTTGAAAAGACCTGCGGAGTT  
 CTGGAACAAGATGAAGGCTTTGGTATGGTTAGAATTGCAGAACCTGTAGGAGTTATTGCAGCAGTAGTCCAACTAATC  
 CAACATCTACAGCAATTTAAATCACTAATAGCTTTAAAACTAGAAATGGTATAGTTTTTACCACATCCAAGGCAAAAA  
 AATCAACTATTGCAGCAGCTAAGATAGTACTTGTATGCAGCAGTTAAAGCTGGTCCCTGAAGGAATTATAGGCTGGATAGA  
 TGAACCTTCTATTGAACCTTTCACAGGTGTAATGAAAGAAGCAGATCTAATCTTGCAACTGGTGACCAGGTATGGTTAAGG  
 CTGCTATTCTCAGGAAAAGCCTGTATAGGAGTTGGTCCAGGTAATACACCTGCTGTAATTGATGAAAGTCCGACATTA  
 ATGGCAGTAAATCAATACTACTTTCAAAAACTTTGATAATGGTATGATTTGTGCTTCAGAGCAGTCAGTAATAGTTGCAAGC  
 TCAATATACGATGAAGTCAAGAAAGAGTTGCAGATAGAGGAGCATATATATTAAGTAAGGATGAAACAGATAAGGTTGGA  
 AAAAATCATGATTAATGGAGCTTTAAATGCTGGAATTGTAGGGCAAAGTGCCTTTAAAATAGCTCAGATGGCGGAGTCA  
 GTGTACCGGAAGATGCTAAAATACTTATAGGAGAAGTTAAATCGGTAGAACCTGAAGAAGAGCCCTTTGCTCATGAAAAGCT  
 GTCTCCAGTTCTAGCCATGTACAAAGCAAAGATTTTGTATGAAGCACTTCTAAAGGCTGGAAGATTAGTTGAACGAGGTGGA  
 ATAGGCGATACATCTGTATTGTATGTAATTCGATGACGGAAAAAGTAAAAGTAGAAAAGTTGAGAGAACTGAAAGACCG  
 GTAGAACATTGATAAATATGCCTTCAGCGCAAGCGCTATAGGAGATATATAACTTTAACTAGCTCCTCTTTGACATTAG  
 GCTGTGTTCTGGGGAGGAACTCTGTATCAGAAAATGTTGGACCTAAACATTTGTTAAACATAAAGAGTGTGCTGAGAG  
 GAGAGAAAATATGCTTTGGTTTAGAGTACCTGAAAAGGTTTATTTCAAATATGGCAGCCTTGGAGTTGCACTAAAAGAACTG  
 AGAATTATGGAGAAGAAAAGGCGTTTATAGTAACGGATAAAGTCTTTATCAATTAGGTTATGTAGATAAAAATTACAAAGA  
 ACCTCGATGAATTAAGAGTTTATATAAAAATATTTACAGATGTAGAACCAGATCCAACCTTGCTACAGCTAAAAAGGTTGCA  
 GCAGAACTGCTTTCCTATGAACCAGATACAATTATAGCAGTTGGTGGTGGTTCGGCAATGGATGCTGCCAAGATCATGTGGG  
 TAATGTATGAGCATCCAGAAGTAAAGATTGAAGATTGGCCATGAGATTTATGGATATAAGAAAGAGAGTATATGTTTTCT  
 AAGATGGGAGAAAAGGCAATGATGATTTTCAAGTACCATCCGAGGAACAGGGTCAGAAGTTACTCCATTTGCAAGTAATTA  
 CGGACGAAAAGAACAGGAGCTAAATATCCTCTGGCTGATTATGAATTAACCTCAAACATGGCTATAGTTGATGAGAACTTAT  
 GATGGGAATGCCAAAGGGGCTAACAGCAGCTTCAAGGTATAGATGCCTTACTCATGCACTGGAGGCTATGTGCAATAATG  
 GCTTCAGAATATACCAACGGATTGGCTCTGAAAGCAACAAGATTAGTATTCAAATATTTGCCAATAGCTTATACAGAAGGTAC  
 AATTAATGTAAGGCAAGAGAAAAATGGCTCATGCTTATGATGATGCAGGTATGGCCTTTGCCAATGCATTTTAGGGGTAT  
 GCCACTCATGGCACAATAAATGGGAGCAGCACCACATACCACATGGAATTTGCCAATGCATTTATGATAGATGAAGTTATA  
 AAATCAATGCTGTAGAGGCTCAAGGAAACAAGCGGCATTTCCACAATATAAATATCCAATGTTAAAAGAAGATATGCTA  
 GAATAGCTGATTACCTAAATTTAGGTGGAAGTACAGATGATGAAAAAGTACAATTGCTAATAAATGCTATAGATGACTTAAA  
 AACTAAGTTAAATTTCAAAGACTATTAAGAAGCAGGAGTTTTCAGAAGATAAATCTATGCTACTTTAGATACAATGTCAG  
 AACTGGCTTTGATGATCAATGTACAGGAGCTAATCCAGATATCCACTAATAGGAGAAAATAAAAACAAATGTATATAAATGCA  
 TTTGATACACCAAGGCAACTGTGGAGAAGAAAACAAGAAAAGAAAAGTAA

FIG. 22

Seq. 40: sequência de AA de desidrogenase de butanol/butiraldeído bifuncional de *C. autoethanogenum*:

MRNLFIFNSIKNKKEVSLMKVTKVTNVEELMKKLDEVTAQKKFSSYTTQEQVDEIFRQAAMAANSARIDLAKMAVEES  
 GMGIVEDKVIKNHFVAEYIYNKYKGEKTCGVLEQDEGFGMVRIAEVGVIAAVVPTTNPSTAIKSLIALKTRNGIVFSP  
 HPRAKKSTIAAKIVLDAAVKAGAPEGIIGWIDEPSIELSQVVMKEADLILATGGPGMVKAAYSSGKPAIGVGPNTPA  
 VIDESADIKMAVNSILLSKTFDNGMICASEQSVIVASSIYDEVKKEFADRGAAYILSKDETDKVGKTIMINGALNAGIVGQS  
 AFKIAQMAGVSVPEDAKILIGEVKSVEPEEFPFAHEKLSPLVAMYKAKDFDEALLKAGRLVERGGIGHTSVLYVNSMTE  
 KVKVEKFRETMTGRTLINMPSAQGAIGDIYNFKLAPSLTLGCGSWGGNSVSENVGPKHLLNIKSVAERRENMLWFR  
 VPEKVYFYKGLGVALKELRIMEKKKAFIVTDKVLVYQLGYVDKITKNLDELRSYKIFDVEPDPTLATAKKGAAELLSYEP  
 DTIIAVGGGSAMDAAKIMWVWYEHPEVRFEDLAMRFMDIRKRVVYFPMGEKAMMISVATSAGTGSEVTPFAVIT  
 DERTGAKYPLADYELTPNMAIVDAELMMGMPKGLTAASGIDALTHALEAYVSIMASEYTNGLALEATRLVFKYLPIAYT  
 EGTINVKAREKMAHASCIAGMFAFLGVCHSMHKLGAQHHPHIGIANALMIDEVIKFNAVEAPRQAAFPQYK  
 YPNVKRRYARIADYLNLGSTDDKVVQLLINAIDDLKTLNPKTIKEAGVSEDKFYATLDTMSELAFFDDQCTGANPRYP  
 LIGEIKQMYINAFDTPKATVEKKTRKKK\*

FIG. 23

Seq. ID 41: sequência de nucleotídeos de deidrogenase de butiraldeído de *C. autoethanogenum*:

ATGAAAGTTACAAACGTAGAAGAACTAATGAAAAGACTAGAAGAAATAAAGGATGCTCAAAGAAATTTGCTACATATACTC  
AAGAACAAGTGGATGAAATTTTAGACAAGCAGCTATGGCAGCTAATAGTGCTAGAATAGAACTAGCTAAAATGGCAGTAG  
AAGAAAGCGGAATGGGAATTTAGAGAAGCAAGGTTATAAAAATCACTTTGCTTCAGAATATATATAACAAATATAAGGA  
TGAAAAAACCCTGTGGAGTTTTAGAGAGAGATGCAGGCTTTGGTATAGTTAGAATTGCGGAACCTGTAGGAGTTATTGCAGCA  
GTAGTTCCAACAATAATCCAACATCTACAGCAATTTAAATCACTAATAGCTTTAAAACTAGAAATGGTATAATTTTTCAC  
CCCATCCAAGGGCAAAGAAATCAACTATTGCAGCAGCTAAAATAGTACTTGACGCTGCAGTTAAAGCTGGTCTCCTGAAGG  
AATTATAGGATGGATAGATGAACCTCCATTGAACCTTTCACAGGTGGTAAATGGGAGAAGCAAATTTAATCTTGCAACTGGTG  
GTCCGGGTATGGTTAAGGCTGCCTATTCTTCAGGCAAACCTGCTGTGGGAGTTGGTCCAGGTAACACACCTGCTGTAATTGAT  
GAAAGTGCCGACATTAATAATGGCAGTAAATTTCAATATTACTATCAAAAACCTTTGATAATGGTATGATTTGTGCCTCAGAGCA  
GTCAGTAATAGTTTTAGACTCAATATATGAGGAAGTTAAAAAAGAATTTGCTTATAGGGGTGCTTATATATTAAGTAAGGATG  
AAACAGATAAGGTTGGAAAAATAATTTAAAAAATGGAGCCTTAAATGCAGGTATTGTAGGACAACCTGCTTTTAAAATAGC  
ACAGCTGGCAGGAGTGGATGTACCAGAAAAAGCTAAAGTACTTATAGGAGAGGTAGAATCGTGAAGTGAAGAACCATT  
TTCTCATGAAAAGTTATCTCCAGTTTTAGCTATGTACAGGGCAAGAAATTTGAGGATGCCATTGCAAAAACCTGATAAAGTGG  
TTAGGGCAGGTGGATTTGGACATACATCTTCATTGTATATAAATCCAATGACAGAAAAAGCAAAGTAGAAAAATTTAGTACT  
ATGATGAAAACATCAAGAACTATAATTAACACACCTTCATCCCAAGGTGGTATAGGTGATATATAAATTTAACTAGCTCCT  
TCTTTGACATTAGGCTGCGGTTCTGGGGGGGAAATTTCTGTATCCGAAAATGTTGGGCCATAACATTTTAAACATAAAAAG  
TGTTGCTGAGAGGAGAGAAAAATGCTTTGGTTAGAGTACCTGAAAAGGTTTATTTCAAATATGGTAGTCTTGGAGTTGCAT  
TAAAAGAGTTAAAAGTTATGAATAAGAAGAAAGTATTTATAGTAAACAGATAAAAGTTCTTTATCAATTAGGTTATGTTGGACAAA  
GTTACAAAAGTCTTGGAGAACTAAAAATTTCTATAAGGTTTACAGATGTAGAACCAGATCCAACCTTGCTACAGCTAA  
AAAAGGTGCAGCAGAACTGCTTTCTATGAACCGGATACAATTATATCAGTTGGTGGTGGTTGAGCAATGGATGCAGCTAAG  
ATCATGTGGTAATGTATGAGCATCCAGAAGTAAAATTTGAAGATTTAGCTATGAGATTTATGGATATAAGAAAGAGAGTAT  
ATGTTTTCCCTAAGATGGGAGAAAAGGCAATGATGATTTAGTAGCAACATCCGAGGAACAGGGTGGGAAGTTACTCCATT  
TGCAAGTATGATGGGAATGCAAGAGGACTTACAGCAGCTTCGGGTATAGATGCATTAACCCATGCACTGGAGGCGTATGT  
GTCAATAATGGCTACAGAATTTACCAATGGATTAGCCCTTGAAGCAGTAAAGTTGATATTTGAATTTACAAAAGCTTATA  
CAGAAGGTACAATAATGTAAAGGCAAGAGAAAAGATGGCTCATGCTTCATGTATTGCAGGTATGGCCTTTGCAATGCATT  
TTTAGGGGTATGCCACTCTATGGCACATAAATTTGGGAGCACAGCATCACATACCACATGGAATGGCAATGCATTATGATAG  
ATGAAGTTATAAAAATCAATGCTGTAGATGATCCAATAAAAACAAGCTGCATTTCCCAATACGAGTATCCAATGCTAGGTAT  
AGATATGCTCAGATAGCTGATTGTCTGAACTTGGGAGGAAAATACAGAAGAGGAAAAGGTACAATAATTAATAAATGCTATAG  
AATGTTAAAAGCTAAGTTAAATATCCAGAAAATAAAAAGAAGCAGGAGTTTCAGAAGATAAATTTCTATGCTACTTTAGAT  
AAAAATGTCAGAATTAGCTTTTGTATGATCAGTGTACAGGAGCTAATCCAAGATATCCACTGATAAGTAAAATAAAAATAAATGTA  
TATAAATGTTTTTGATAAAACCGAACCAATTGTAGAAGATGAAGAAAAGTAA

Seq. ID 42: sequência de aminoácidos de deidrogenase de butiraldeído de *C. autoethanogenum*

MKVTNVEELMKRLEEIKDAQKFKATYTYTQEQVDEIFRQAAMAANSARIELAKMAVEESGMGIVEDKVIKNHFASEYIYNKYKDEKTC  
GVLERDAGFGIVRIAEPVGVIAAVVPTTNPSTAIKSLIALKTRNGIIFSPHPRAKSTIAAAKIVLDAAVKAGAPEGIIGWIDEPSIELS  
QVVMGEANLILATGGPGMVKAAYSSGKPAVGVGPNTPAVIDESADIKMAVNSILLSKTFDNGMICASEQSVIVLDSIYEEVKKEF  
AYRGAYILSKDETDKVGKILKNGALNAGIVGQPAFKIAQLAGVDVPEKAKVLIGEVESELEEPSHEKLSGVLAMYRARNFEDIAK  
TDKLVRAAGGFHGTSSLYINPMTEKAKVEKVFSTMMKTSRTIINTPSSQGGIGDIYNFKLAPSLTLGCGSWGGNSVSENVGPKHLLNIK  
SVAERRENMLWFRVPEKVYFKYGLSLGVALKELKVMNKKKVFIVTDKVLVYQLGYVDKVTKVLEELKNFL\*

FIG. 24

Seq. ID 43: sequência de nucleotídeos de desidrogenase de butiraldeído de *C. autoethanogenum*:

TTGGAAAATTTTGATAAAGACTTACGTTCTATACAAGAAGCAAGAGATCTTGCACGTTTAGGAAAAATTGCAGCAGACCAAAT  
 TGCTGATTACTGAAGAACAAATTGATAAAATCCTATGTAATATGGTTAGGGTAGCAGAAGAAAATGCAGTTTGCCTTGGTA  
 AAATGGCTGCAGAAGAACTGGTTTTGGAAAAGCTGAAGATAAGGCTTATAAAGAACCATATGGCTGCTACTACAGTATATAA  
 TTACATCAAGGATATGAAGACTATTGGTGTATAAAAAGAAGATAAAAGTGAAGGTGTAATTGAATTTGCAGAACCAGTTGGT  
 TTATTAATGGGTATTGTACCATCTACAAATCCAACATCTACTGTTATTTATAAATCAATCATTGCAATTAATCAAGAAAATGCAA  
 TTGTATTCTACCACACCCAGCTGCATTAATGTTCAACAAAAGCAATAGAACTTATGCGTGATGCAGCAGTAGCAGCAGGA  
 GCTCCTGCAAAATGTAATTGGTGGTATTGTTACACCATCTATACAAGCTACAAATGAACTTATGAAAGCTAAAGAAGTTGCTAT  
 GATAATTGCAACTGGAGGCCCTGGAATGGTAAAGGCTGCATATAGTTTCAAGAACCTGCAATAGGCGTTGGTCTGGTAAAC  
 TCTCCATCTATATTGAAAGAAGCTGCTGATGTTTCAATCAGTTAAAGATATAATAGCTAGTAAGAGTTTTGACTATGGTACT  
 ATTTGTGCATCCGAGCAGTCTGTAATTGCAGAAGAATGCAACCATGATGAAATAGTAGCTGAATTTAAGAAAACAAGGCGGAT  
 ATTTGATGACAGCTGAAGAACTGCAAAAGTTTGCAGCGTACTTTTTAAACCTGGTACACACAGCATGAGCGCTAAGTTTGT  
 GGAAGAGCTCCTCAGGTTATAGCAGAAGCTGCAGGTTTACAGTTCCAGAAGGAACAAAAGTATTAATAGGAGAACAAGGC  
 GGAGTTGGTAATGGTTACCCTCTATCTTATGAGAACTTACAACAGTACTTGTCTTCTATACAGTTAAAGATTGGCATGAAGC  
 ATGTGAGCTTAGTATAAGATTACTTCAAAATGGTCTTGGACATACAATGAACATTATACAAATGATAGAGACTTAGTAATGA  
 AGTTTGTCAAAAACCCAGCATCCCCTATCTTAGTAACTGGTGGAAAGCCAGGGAGGACTGGTGAAGCACAGGATTAGC  
 ACCTGCATTTACATTAGGTTGGTACATGGGGAGGAAGCTCTGTTTCTGAAATGTTACTCCATTACATTAATCAATATAAA  
 GAGAGTAGCATATGGTCTTAAAGATTGACTACATTAGCTGCAGACGATACAACCTTCAATCATCTGAACTTTGCGGAAGCA  
 AAAATGACTTAGGATTCTGTCTACAAGCCCTGCAGAATTTGCAGCAAGAGCAATTTGATAGCACTGCTGCAGATACTACT  
 GATAATGATAAACTTGTAGACTCGTAAGTGAATTAGTAGCTGCAATGAAGGGAGCTAACTAA

Seq. ID 44: sequência de aminoácidos de desidrogenase de butiraldeído de *C. autoethanogenum*:

MENFDKDLRSIQEARLRLGKIAADQIADYTEEQIDKILCNMVRVAEENAVCLGKMAAEETGFGKAEDKAYKNHMAATTVVNYI  
 KDMKTIGVIKEDKSEGVIEFAEPVGLLMGIVPSTNPTSTVIYKSIIAIKSRNAIVFSPHPAALKCSTKAIELMRDAAVAAGAPANVIGGI  
 VTPSIQATNELMKAKEVAMIIATGGPGMVKAAYSSGTPAIGVAGNSPSYIERTADVHQSVKDIASKSFDYGTICASEQSVIAEECN  
 HDEIVAEFKQGGYFM TAEETAQKVCVLFKPGTHSMSAKFVGRAPQVIAEAGFTVPEGTKVLIGEQQGGVNGYPLSYEKLTTVLA  
 FYTVKDWHEACELSRLLQNLGHTMNIHTNDRDLVMKFAKFPASRILVNTGGSQGGTGASTGLAPFTLGCCTWGGSSVSENV  
 TPLHLINIKRVAYGLKDCTLAADDTTFNHPELGCCKNDLGFCAATSPAEFAAKSNCDSTAADTTDNDKLARLSELVAAMKGAN

FIG. 25

Seq. ID 45: sequência de nucleotídeos de desidrogenase de butiraldeído de *C. autoethanogenum*

GTGGAAAATGCTGCAGCAGCAGCAAAAAATGTTAGCAACCTTCCACAAGAAAAGCTAGATGAGATTGTTGAACGTATGGCGG  
 AAGAAATCGGAAAACATACCCGAGAGCTTGTCTGTAATGTACAGGATGAAACTGGTTATGGAAAATGGCAGGATAAATGCA  
 TCAAAAACCGATTGCTGTGAGTATTTGCCAGCTAAGCTTAGAGGAATGCGATGTGTAGGTATTATTAATGAAAATGGTCAG  
 GATAAGACCATGGATGTAGGTGTACCTATGGGTGTAATTATGCATTATGTCCTGCAACTAGTCCGGTTTCTACTACCATATAT  
 AAGGCATTGATTGCAATTAAGTCTGGTAATGCAATTATCTTTTCCACATCCTAGAGCAAAGGAGACAATTTGTAAGGCGCT  
 TGACATCATGATTCTGTGAGTGAAGGATATGGGCTTCCAGAAGGAGCTTTCGCATACTTACATACTGTGACGCCTAGTGGGA  
 ACAATCGAATTGATGAACCATATTGCGACTTCTTTGATTATGAATACAGGTGTCCCGGGATGCTTAAAGCAGCATATAATTCT  
 GGGAAACCTGTTATATATGGAGGAAGTGGTAAATGGACCAGCATTATTGAACTGACAGCTGACATCAAAACAGGCGGTA  
 GATATTATTGCTAGTAAGACCTTTGATAACGGAATAGTACCATCAGCTGAACAATCTATTGTTGTAGATAGCTGTGTTGCATCT  
 GATGTTAAACGTGAGTTGCAAAATAATGGTGCATATTTGATGACAGAGGAGGAAGCAGCAAAAACCTAGGTTCTCTTTTTCCG  
 TTCTGATGGCAGTATGGATTGAGAAATGGTTGGCAAATCCGCACAAAGATTGGCTAAAAAAGCAGGTTTCCAGATTCCCTGAA  
 AGTAGCACAGTGCTAATTCAGAGCAGAAATATGTTTCTCAAGATAATCCTTATTCCAAGGAGAAAATTTGTCGGTACTAGC  
 TTACTACATTGAAAGATGATTGGATGCATGCATGTGAAAAGTGTATTGAACTGCTGTTAAGTGAGAGACATGGTCACACTCTTG  
 TTATACATTCAAAAGACGAAGATGTAATTCGCCAGTTTGCATTAATAAATCCTGTAGGTAGGATACTTGTAAATACGCCTGCT  
 TCCTTTGGTAGTATGGGTGCTACAAGTAATTTTCTGCTTTAACTTTAGGTAGTGGATCGGCAGGTAAGGTATTACCTCC  
 GATAATGTTTACCAATGAATCTTATTACGTCGCAAGTCCGGATATGGCGTACGGAATGTAGAAGAGATTGCAATACTAA  
 TGGATTGTTTACAGAAAGAAAAGTGAATTTGAATGGAATGACAAAAAGTCAGACTATAATCCAGAGGATATACAATGTTA  
 CAGCATATTTAAAAAAGCTATGGAAAAATTAATAG

FIG. 26



Seq. ID 46: sequência de aminoácidos de desidrogenase de butiraldeído de *C. autoethanogenum*:  
 MENAARAQKMLATFPQEKLDEIVERMAEEIGKHTRELAVMSQDETGYGKWQDKCIKRFACEYLPAKLRGMRCVGIINENGQD  
 KTMDVGVPMGVIIALCPATSPVSTTIYKALIAIKSGNAIIFSPHPRAKETICKALDIMIRAAEGYGLPEGALAYLHTVTPSGTIELMNH  
 ATSLIMNTGVPGLKAAAYNSGKPVYGGTGNPFIERTADIKQAVKDIIASKTFDNGIVPSAEQSVVDSVADSVKRELQNNGAY  
 FMTEEEAQKLSLFFRSDGSMDSMVMGKSAQRLAKKAGFSIPESSTVLISEQKYVSQDNPPYSKEKLCPLVAYIEDDWMHACEKICIE  
 LLLSERHGH TLVIHSDKEDVIRQFALKKPVGRILVNTPASFGSMGATS NLFPAL TLGSGSAGKGITSDNVSPMNLIVYVRKVGYGVVRN  
 VEEIVNTNGLFTEEKSDLNGMTKKS DYNPEDIQMLQHLK KAMEKIK\*

Seq. ID 119: sequência de nucleotídeos de desidrogenase de butanol de *C. autoethanogenum*:  
 ATGGCAAGATTACTTTACCAAGAGACATTTATTTGGAGAAAATTCATTAGAAACCTTGAAAGACCTAGATGGAAAAAAGC  
 TGTTATTGTCGTAGGTGGTGGATCCATGAAACGATTTGGATTCCCTTGATAAGGTAGTAAACTACTTAAAAAGAACGAGGTATTG  
 AATCAAAATTAATAGAAGGAGTTGAACCAAGATCCATCTGTAGAACTGTTATGAATGGCGCTAAACTAATGAGAGAATATGA  
 ACCAGATTTAATAGTATCAATAGTGGAGGTTCCACCAATTGACGCAGCAAAAGCTATGTGGATATTCTATGAATACCCTGAGT  
 TACTTTTAAAGAGGCTGTGGTCCCTTTGGTCTTCTAAATTAAGACAAAAGCAACATTTATAGCTATACCTTCTACAAGTG  
 GTACTGCAACAGAAGTAACGGCATTCTGTAATAACAGACTATAAAGCTAAAATTAATATCCTTTAGCTGACTTCAATTTAA  
 CACCAGATATAGCTATAATTGATCCAGCATTAGCTCAAACAATGCCACCTAAATTAAGTGCACATACTGGAATGGATGCACCT  
 ACCCATGCTATTGAAGCATATGTTGCAGGACTTCATTGAGTTTCTCAGATCCTTCTGCTATTCAAGCTATAGTTATGGTAAATC  
 AGTATTTAATTAATCTTACAATGAAGATAAAGAAGCTAGAAACCAATGCATTTAGCTCAATGTTTAGCTGGAATGGCATT  
 TCAATGCACCTCTTGAATAACTCACAGTTTAGCACATAAAAACAGGTGCGATTTCCATATCTCTCATGGATGTGCCAATGCA  
 ATATATCTCCCTATGTTATAGATTTCAATAAAAAAGCTTGTACACCAAGATATGCTGATATAGCTAGGAGTCTTAACTTCCA  
 GGAAACTGATGATGAATTAGTAGATTCATTAACATGATTAAGATATGAACAAGAGTATGGATATTCCTTTGACATT  
 AAAAGATTACGGAGTAGATGAAAAAGAAATTAAGATAATGAAGATTTTATAGCTCATAATGCCGTATTAGATGCCTGCACT  
 GGATCAATCCTAGAAGTATAAATGATGCTGAAATGAAAAAATGTTAGAATACATCTATTATGGTAAAAAGGTTGATTTTAA  
 A

FIG. 27

Seq. ID 120: sequência de aminoácidos de desidrogenase de butanol de *C. autoethanogenum*:  
 MARFTLPRDIYFGENSLETLDKLDGKAVIVVGGGSMKRFGLDKVNVYLKEAGIESKLIIEGVEPDPSVETVMNGAKLMREYEPDLI  
 VSI GGGSPIDA AKAMWIFIEYPEFTFKEAVVPFGLPKLRQKATFIAIPSTSGTATEVTAFSVITDYKAKIKYPLADFNLTPIAIIIDPALA  
 QTMPPKLTAAHTGMDALHTAIEAYVAGLHVSFSDPLAIQAIVMVNQYLIKSYNEDKEARNQMHLAQCLAGMAFSNALLGITHSLAH  
 KTGAVFHIPHCANAIYLPYVIDFNKCACTPRYADIARSLKLPNGTDDDELVDLSLNMIIKDMNKSMDIPLTLKDYGVDEKEFKDNEDF  
 IAHNAVLDACTGSNPRSINDAEMKKLLEYIYGGKVDV\*

Seq. ID 121: sequência de nucleotídeos de desidrogenase de butanol de *C. autoethanogenum*:  
 ATGGGAAGATTACTTTGCTAGGGATTTACTTTGGTGAAAATGCCTTAGAAAATTTAAAAATTTAGATGGAAATAAAGC  
 AGTAGTTGTTGTAGGTGGGGGATCTATGAAGAGATTTGGATTCTTAGCCAAAGTTGAAAAACTTAAAAAGAACTGGTATG  
 GAAGTTAAATTAATAGAAGGTGTTGAGCCTGATCCGTCTGTTGATACTGTTATGAATGGCGCTAAAATAATGAGAGACTTTAA  
 CCCAGATTGGATAGTATCAATAGGTGGAGGATCTCCCATAGATGCTGCTAAAGCAATGTGGATTTTTATGAATACCCGACT  
 TTACATTTGAAAAAGCGGTAGTCCCTTTTGGAAATCTAAATTAAGGCAGAAAGCACAATTTGTTGCTATACCTTCTACAAGTG  
 GAACAGCAACTGAAGTAACATCATTTCTGTAATAACAGACTATAAAGCTAAAATAAAATATCCTCTTGCAAGATTTAACCTTA  
 CCCCTGATATAGCTATAATAGATCCGTCTCTGCGAAAAAAGCTTACAGCACACACTGGAATGGATGCACTT  
 ACTCAGCAATAGAAGCATATGTAGCAAGTTTACATTCAGATTTCTCAGATCCACTTGCATGCTATAACCATGATTCAT  
 AAATATTTATTGAAATCCTATGAAGAAGATAAAGAAGCTAGAGGACATATGCATATAGCCCAATGTCTAGCTGGGATGGCAT  
 TTTCAATGCTCTCTTGAATAACTCATAGTATAGCACATAAACTGGTGCAATTTTACATACCTCATGGGTGTGCTAATG  
 CCATATACTTACCTTATGTTATAGATTTTAAACAAGAAAGCTTGTTCAGAAAGATATGCTAAAATAGCCAAAAAGCTGCATCTAT  
 CAGGAAATAGTGAAGATGAGCTAATAGATTCATTAAGTAACTGAAATGATTCGACTATGAACAAAAAGATGGATATTCCTCTACC  
 ATAAAAGATTATGGTATAAGCGAAAACGATTTAATGAAAACCTAGATTTTATAGCTCACAATGCCATGATGGATGCCTGCAC  
 TGGATCAATCCTAGAGCAATAACTGAGGAAGAAATGAAAAAGCTTTCAGATATATGTATAATGGGCAAAAGGTTAATTTCT  
 TAG

FIG. 28

Seq. ID 122: sequência de aminoácidos de deidrogenase de butanol de *C. autoethanogenum*:

MGRFTLPRDIYFGENALENLKLDGNKAVVVVGGGSMKRFGLAKVEKYLKETGMEVKLIEGVEPDPSVDTVMNGA  
KIMRDFNPDWIVSIGGGSPIDAAMWIFYEYDFTEKAVVFPGIPKLRQKAQFVAIPSTSGTATEVTSFSVITDYKAKI  
KYPLADFNLPDIAIIDPSLAETMPKKLTAHTGMDALTHAIEAYVASLHSDPFLAMHAITMIHKYLLKS YEEDKEARG  
HMHIAQCLAGMAFSNALLGITHSIAHKTGAVFHIPHCANAIYLPYVIDFNKKACSERYAKIAKKLHLSGNSDELIDSLT  
EMIRTMNKKMDIPLTIKDYGISENDFNENLDFIAHNAMMDACTGSNPRAITEEMKLLQYMYNGQKVN\*F

Seq. ID 51: sequência de nucleotídeos de deidrogenase de butanol de *C. autoethanogenum*:

ATGAAAGTTACAAACGTAGAAGAACTAATGAAAAGACTAGAAGAAATAAAGGATGCTCAAAAGAAATTTGCTAC  
ATATACTCAAGAACAAGTGGATGAAATTTTAGACAAGCAGCTATGGCAGCTAATAGTGCTAGAATAGAAGTACG  
TAAAATGGCAGTAGAAGAAAGCGGAATGGGAATTGTAGAAGACAAGGTTATTAATAAATCACTTTGCTTCAGAAT  
ATATATATAACAAATATAAGGATGAAAAACCTGTGGAGTTTTAGAGAGAGATGCAGGCTTTGGTATAGTTAGA  
ATTGCGGAACCTGTAGGAGTTATTGCAGCAGTAGTTCACAACACTAATCCAACATCTACAGCAATATTTAAATCAC  
TAATAGCTTTAAAACTAGAAATGGTATAATTTTTACCCCATCCAAGGGCAAAGAAATCAACTATTGCAGCAGC  
TAAAATAGTACTTGACGCTGCAGTTAAAGCTGGTCTCCTGAAGGAATTATAGGATGGATAGATGAACCTCCAT  
TGAACCTTCACAGGTGGTAATGGGAGAAGCAAATTAATTCTTGAACCTGGTGGTCCGGGTATGGTTAAGGCTGC  
CTATTCTTCAGGCAAACCTGCTGTGGGAGTTGGTCCAGGTAACACACCTGCTGTAATTGATGAAAGTGCCGACAT  
TAAAATGGCAGTAAATCAATATTAATCAAAAACTTTTGATAATGGTATGATTTGTCCCTCAGAGCAGTCAGTA  
ATAGTTTTAGACTCAATATATGAGGAAGTTAAAAAGAATTTGCTTATAGGGGTGCTTATATATTAAGTAAGGAT  
GAAACAGATAAGGTTGGAAAAATAATTTAAAAAATGGAGCCTTAAATGCAGGTATTGTAGGACAACCTGCTTTT  
AAAATAGCACAGCTGGCAGGAGTGGATGTACCAGAAAAAGCTAAAGTACTTATAGGAGAGGTAGAATCGGTAG  
AACTTGAAGAACCATTTTCTCATGAAAAGTTATCTCCAGTTTTAGCTATGTACAGGGCAAAGAAATTTGAGGATGC  
CATTGCAAAAACCTGATAAACTGGTTAGGGCAGGTGGATTTGGACATACATCTTCATTGTATATAAATCCAATGAC  
AGAAAAAGCAAAAGTAGAAAAATTTAGTACTATGATGAAAACATCAAGAACTATAATTAACACACCTTCATCCCA  
AGGTGGTATAGGTGATATATAAATTTAACTAGCTCCTTCTTGACATTAGGCTGCGGTTCCCTGGGGGGGAA  
TTCTGTATCCGAAAATGTTGGCCTAAACATTTATTAACATAAAAAGTGTGCTGAGAGGAGAGAAAAATATGCT  
TTGGTTTAGAGTACCTGAAAAGGTTATTTCAAATATGGTAGTCTTGGAGTTGCATTAAGAGTTAAAAGTTATG  
AATAAGAAGAAAGTATTTATAGTAACAGATAAAGTCTTTATCAATTAGGTTATGTGGACAAAGTTACAAAAGTT  
CTTGAGGAACTAAAAATTTCTATAAGGTATTTACAGATGTAGAACCAGATCCAACCTTGCTACAGCTAAAAAA  
GGTGCAGCAGAACTGCTTTCTATGAACCGGATACAATTATACAGTTGGTGGTGGTTGAGCAATGGATGCAGCT  
AAGATCATGTGGTAATGTATGAGCATCCAGAAGTAAATTTGAAGATTTAGCTATGAGATTTATGGATATAAGA  
AAGAGAGTATATGTTTTCCCTAAGATGGGAGAAAAGGCAATGATGATTTGAGTAGCAACATCCGCAGGAACAGG  
GTCGGAAGTTACTCCATTTGCAGTAATCACTGATGAAAAACAGGAGCTAAATATCCATTAGCTGATTATGAACT  
AACTCCAGACATGGCTATAGTTGATGCAGAACTTATGATGGGAATGCCAAGAGGACTTACAGCAGCTTCGGGTA  
TAGATGCATTAACCCATGCACTGGAGGCGTATGTGTCAATAATGGCTACAGAATTTACCAATGGATTAGCCCTTG  
AAGCAGTAAAGTTGATATTTGAATTTACCAAAAGCTTATACAGAAGGTACAATAATGTAAGGCAAGAGAAA  
AGATGGCTCATGCTTCATGTATTGCAGGTATGGCCTTTGCAAATGCATTTTAGGGGTATGCCACTCTATGGCACA  
TAAATTGGGAGCACAGCATCACATACCACATGGAATTGCCAATGCACTTATGATAGATGAAGTTATAAAATTCAA  
TGCTGTAGATGATCCAATAAAACAAGCTGCATTTCCCAATACGAGTATCCAATGCTAGGTATAGATATGCTCA  
GATAGCTGATTGCTGAACTTGGGAGGAAATACAGAAGAGGAAAAGGTACAACACTATTAATAAATGCTATAGATG  
ATTTAAAAGCTAAGTTAAATATTCCAGAACTATAAAAAGGAGGAGGTTTTCAGAAGATAAATTTCTATGCTACTTT  
AGATAAAATGTCAGAATTAGCTTTTGTATGATCAGTGTACAGGAGCTAATCCAAGATATCCACTGATAAGTGAAT  
AAAACAAATGTATATAAATGTTTTTGATAAAACCGAACCAATTGTAGAAGATGAAGAAAAGTAA

FIG. 29

Seq. ID 52: sequência de aminoácidos de deidrogenase de butanol de *C. autoethanogenum*:

MDAAKIMVWVMEHPEVKFEDLAMRFMDIRKRVYVFPKMGKAMMISVATSAGTGSEVTPFAVITDEKTKAKYPLADYELTPDM  
AIVDAELMMGMGRGLTAASGIDALTHALEAYVSIMATEFTNGLALEAVKLIFEYLPKAYTEGTTNVKAREKMAHASCIAGMAFAN  
AFLGVCHSMAHKLGAQHHPHGIANALMIDEVIKFNVAVDPIKQAAFPOQEYPNARYRYAQIADCLNLGGNTEEEKVQLLINAIDD  
LKAKLNIPETIKEAGVSEDKFYATLDKMSELAFDDQCTGANPRYPLISEIKQMVINVFDKTEPIVEDEEK\*

Seq. ID 53: sequência de nucleotídeos de deidrogenase de butanol de *C. autoethanogenum*:

ATGGAATAAAATTAGGGGGAATAATAATGGAGAGATTTACGTTGCCAAGAGACATTTACTTTGGAGAAGATGCTTTGGGTG  
CTTTGAAAACGTTAAAAGGTAAGAAAAGCTGTAGTAGTTGTTGGAGGAGGATCCATGAAGAGATTCCGTTTCTTGACAAGGT  
AGAAGAATACTTAAAAGAAGCAAACATAGAAGTTAAACTAATAGAAGGTGTTGAACCAGATCCGTTCTGTGGAACCGTTATG  
AAAGGTGCCAAAATAATGACAGAATTTGGCCAGATTGGATAGTTGCTATTGGAGGAGGTTACCAATAGATGCTGCAAAG  
GCTATGTGGCTATTTTATGAATATCCAGATTTTACTTTTAAACAAGCAATTGTTCCGTTTGGATTACCAGAATTAAGACAAAA  
GCTAAATTTGTAGCTATAGCTTCTACTAGTGGACAGCTACTGAAGTTACTTCATTTTCAGTAATAACTGATTATAAAGCTAAA  
ATAAAGTATCCTTTAGCTGACTTCAATTTGACACCGGATATAGCTATAGTTGATCCAGCATTAGCCCAGACAATGCCACCTAAA  
TTAACTGCACATACTGGTATGGATGCATTAACCTATGCACTAGAAGCTTATGTAGCATCAGCTAGATCAGATATTTAGATCCA  
CTTGCAATACATTCCATAATTATGACAAGGGATAACTTACTTAAATCCTATAAGGGTGATAAAGATGCTAGAAAATAAGATGCA  
TATATCACAATGTTTAGCAGGTATGGCATTCTAATGCACCTCTTGGTATAACTCATAGTTTAGCACATAAAAACAGGAGCTGT  
ATGGCACATAACCACATGGATGCGCTAATGCAATATATCTCCATATGTTTTAGATTTTAATAAAAAAGCTTGCTCAGATAGATA  
TGCTAATATAGCTAAAATATTAGGACTTAAAGGAAGCTACTGAAGATGAATTGGTAGATTCTCTAGTTAAAATGGTACAAGATA  
TGGATAAGGAATTGAATATACCTTTGACCTTAAAAGATTATGGTATAAGCAAAGATGATTTCAATTCAAATGTTGATTTTATAG  
CAAAGAATGCGCTCTTAGATGCATGTACAGGAGCTAATCCAAGGCCTATAGATTTTGATCAAATGAAAAAGATACTTCAATGT  
ATATATGATGGAAAAAGGTAACCTTTTAA

FIG. 30

Seq. ID 54: sequência de aminoácidos de deidrogenase de butanol de *C. autoethanogenum*:

MEIKLGGIIMERFTLPRDIYFGEDALGALKTLKGGKAVVVVGGGSMKRFGLDKVEEYLKEANIEVKLIEGVEPDPSVETVMKGAKI  
MTEFGPDWIVAIGGGSPIDAAMWVLFYEYDFTFKQAIVPFGLPELRQKAKFVAIASTSGTATEVTSFSVITDYKAKIKYPLADFNL  
TPDIAIVPALAQTMPPKLTAHTGMDALTHALEAYVASARSDISDPLAIHSIIMTRDNLKSYKGDKDARNKMHISQCLAGMAFSN  
ALLGITHSLAHTGAVWHIPHGCAAIYLPVYLDFNKACSDRYANIAKILGLKGTTEDELVDLSVKMVQDMDKELNIPLLKDYGIS  
KDDFNSNVDFIAKNALLDACTGANPRPIDFDQMKKILQCIYDGKKVTF\*

Seq. ID 55: sequência de nucleotídeos de deidrogenase de butanol de *C. autoethanogenum*:

GTCAGGGATGTTATTATGGAAAACCTTTATTTTAAAAATGCTACAGAAATTTTGGTAAGGATACCGAAAATCTTGTAGG  
AAGTAAAGTAAAGGAGTATTCAAAGTCAGATAAAAATACTCTTTTGCTATGGGGGAGGAAGCATAAAAAGATCTGGTCTATAT  
GATAGAGTTATAAAGTCCTTAAAAGAAAATGGAATTGAATTTATAGAAGTCCAGGAATTAACCTAATCCAAGATTAGGACC  
TGTTAAAAGAAGGTATAAGACTATGTAGAGAAAATAATAAAAATTTGTACTATCTGTAGGAGGAGGAAGTTCAGCAGATACG  
GCTAAAGCTATTGCTGTAGGAGTACCTTATAAAGGAGACGTATGGGATTTTATACGGGCAAAGCTGAAGTGAAAGAGGCTC  
TTCTGTAGGAGTTGAATAACATTACCTGCTACAGGTACAGAATCTAGTAATAGTTCTGTTATTATGAATGAAGATGGTTGG  
TTTTAAAAAGGATTAATAACAGTACTTATAAGACCTGCTTTTCAATTATGAATCTGAAGTACTTTTACTACTACCAGAGTATC  
AACTGCTTGTGGTCTTGTGACATTATGGCACATATAATGAAAAGATATTTTACAAATGTGAAACATGTAGATATAACTGAT  
AGGCTTTGCGAAGCTGCATTAAGAAATGTTATAAATAATGCCCAATAGTTTTAAAAGATCCCAAAAATATGATGCTAGGGC  
AGAAATATGTGGACCGTACTATAGCTCATAATGATGTGCTTAGTGCAGGATAGAATAGGTGATTGGGCTTCTACAAAAT  
GAACATGAATTGAGTGGGGAACAGACATTGCCATGGAGCAGGACTTGCAATTTGATTTTCTGCATGGATGAAATATGTAT  
ATAAACACGATATCAATAGATTTGTACAATTTGCAGTAAGGGTATGGGATGTAGATTTATCTTATAGTTTCTGCGAAGATATT  
GTAAGATAAAATGAAGAAATGGCTAATAAGTGCACGGATAATGGAAGTAAAAGTAAAGGATAAGGATAAGGATAAGGATAAGG  
ATGATATTGAAAAATATTAATTTAGCTAAATAA

FIG. 31

Seq. ID 56: sequência de aminoácidos de deidrogenase de butanol de *C. autoethanogenum*:

VRDVIMENFIKFNATEIIFGKDTENLVGSKVKEYSKSDKILFCYGGSSIKRSGLYDRVIKSLKENGIEFIEIPGKPNPRLGPVKEGIRLCR  
ENNIKFVLSVGGSSADTAKIAVGVYPYKGDVWDFYTGKAEVKEALPVGVVITLPATGTESSNSSVIMNEDGWFKKGLNVLIRPA  
FSIMNPELFTLPEYQTACGACDIMAHIMERYFTNVKHVDITDRLCEAALRNVINNAPIVLKDPKNYDARAEIMWTGTIAHNDVLS  
AGRIGDWSHAKIEHELSETDIAHGAGLAIVFPAWMKYVYKHDINRFVQFAVRVWVDVLSYSSCEDIVLEGIRRMATAFFKSMGLP  
VTLKEGSIGEDKIEEMANKCTDNGTKTVGQFVKLNKDDIVKILNLAK\*

Seq. ID 57: sequência de nucleotídeos de deidrogenase de butanol de *C. autoethanogenum*:

ATGGAAGACAAGTTTGAAAATTTAATTTGAAATCCAAGATTTATTTAATAGGGAATCTATCCAATTTTAGAGCAAGTCACT  
GGTTCGAGCATTATTGTTGCAGATGCTATTATGGGAAAACCTGGATATCTCAAAAAGTAATAGATTACCTAAGCAAAGC  
TGGAATAAGTTCGGTTGTTTTACGGGGTACACCTGATCCAGACGCTCAATGTAATTGCAGATGCAATGAAATGTACAAAA  
AAAGCGACGCAGATGTTCTCGTAGCACTAGGTGGAGGATCCAGTATTGATACCGCTAAGGGAATAATGTATTTTGCATGTAA  
TTAGGAAAAGCAATGGGCCAAGAAATGAAAAACCTCTATTTATTGCAATCCATCAACAAGTGGTACAGGCTCTGAAGTA  
ACAACTTTACTGTTATTACTTCTCAGAAAGAAAAGGTATGCATTATAGATGATTTTATTGCACCAGATGTTGCAACTTGTAC  
TCAAGTTGATTGATGGTCTGCCTCAGCGTATTGTAGCAGATACTGGTATAGATGTTCTAGTTCATTCTATTGAAGCCTATGTT  
TCCAAAAAGCAACTGACTTACAGACGCTCTTGCTGAAAAAGCAGTAAATTAATTTTGAAGTCTTCCAAAAATTTATAAC  
GATAGTAAGGATTCCGAAGCTCGAGATCATGTTCAAACGCTTCTGTATAGCAGGAATAGCATTACAAATGCTGGTCTTGG  
AATTAATCACAGCTTGGCTCATGCTATGGGTGGATCTTCCACATTCCTCACGGCCGATCCAATGCACTTCTACTTAATGCAGT  
AATGGAATACAACGCTAGCTTGGTTGAAAATGCAAGCGAATGCTATGGAAAAATACGCAAACTAGCATCAATCTACAC  
CTTCCAGCTCGAACAACTCGGAAGGCGCTGTAAGTTTTATTGAAGCTGTAGATAAATTAATAAAATCCCTAGGTGTTGAAGA  
TAATATTCGATCTCTGGGATTAAGAAGATGAGTTTCAAAGTGCTCAATCATATGGCAGAAAACAGCAATGCAAGATAGAT  
GCACTCCAATACTTAGAAAACCTTCTAAAGAAGAACTTATACATATTTATCAAAAATGTTATTA

FIG. 32

Seq. ID 58: sequência de aminoácidos de deidrogenase de butanol de *C. autoethanogenum*:

MEDKFENFNLKSKIYFNRESIQLLEQVTGSRFIVADAIMGKLGYLQKVIDYLSKAGISSVVFTGVHPDPDVIADAMKLYKKSAD  
VLVALGGSSIDTAKGIMYFACNLGKAMGQEMKKPLFIAIPSTSGTGSEVTNFTVITSQKEKVICIIDFIAPDVAILDSSCIDGLPQRIV  
ADTGIDVLVHSIEAYVSKATDFTDALAEKAVKLIFENLPKIYNDSKDEARDHVQNASCIAGIAFTNAGLGINHSLAHAMGGSFHIP  
HGRSNALLNAVMEYNASLVGNASEHAMEKYAKLASILHLPARTTREGAVSFIEAVDKLIKSLGVEDNIRSLGIKEDFQALNHMA  
ETAMQDRCTPTNPRKPSKEELIHVYQKCY\*

Seq. ID 59: sequência de nucleotídeos de butiril/acetil transferase de fosfato de *C. autoethanogenum*:

ATGGAATAAATTTGGAGTAAAGGCAAAGGAAGACAAAAAAGATTGTCTTAGCTGAAGGAGAAGAAAGAACTCTTCAA  
GCTTGTGAAAAATAATTAAGAGGGTATTGCAATTAATCCTTGTAGGGAATGAAAAGGTAATAAAAGAAAAGCGTCAA  
AATTAGGTGTAAGTTAAATGGAGCAGAAATAGTAGATCCAGAGATTTAGATAAACTAAAGGCATATGCAGATGCTTTTTAT  
GAATTGAGAAAAGAAAGGGAATAACGCCAGAAAAAGCGGATAAAATAGTAAGAGATCCAATATACTTTGCTACAATGATG  
GTTAACTTGGAGATGCAGATGGATTGGTTTTCAGGTGCGGTTACTACTACAGGCGATCTTTGAGACCAGGACTTCAAATAGT  
AAAGACAGCTCCAGGTACATCAGTAGTTCCAGTACATTTATAATGGAAAGTACCAAATTTGTGAGTATGGTGACAATGGTGTAC  
TTCTATTTGCTGATTGTGCTGTAATCCATGCCAGATAGTGATCAATGGCTCAATTGCAATAAGTACAGCAGAACTGCAA  
AGAACTTATGTGGAATGGATCCAAAAGTAGCAATGCTTTTCTACTAAGGGAAGTGCAAAACACGAATTAGTAGACAA  
AGTTAGAAATGCTGTAGAGATTGCAAAAAAGCTAAACCAGATTTAAGTTTAGACGGAGAATTACAATTAGATGCCTCTATC  
GTAGAAAAGGTTGCAAGTTTAAAGGCTCCTGGAAGTGAAGTAGCAGGAAAAGCAAATGTACTTGTATTTCCAGATCTCCAAG  
CAGGAAATATAGGCTATAAACTCGTTCAAAGATTTGCAAAAAGCAGATGCTATAGGACCTGTATGCCAAGGATTTGCAAAAACC  
TATAAATGATTTGCAAGAGGATGTAATCTGATGATATAGTAAATGTAGTAGCTGTAAACAGCAGTTCAAGCACAAGCTCAA  
AGTAA

Seq. ID 60: sequência de aminoácidos de butiril/acetil transferase de fosfato de *C. autoethanogenum*:

MEKIWSKAKEDKKKIVLAEGEEERTLQACEKIIKEGIANLILVGNKVIKEKASKLGVSLNGAEIVDPEISDKL KAYADAFYELRKKKGIT  
PEKADKIVRDPPIYFATMMVKLGDADGLVSGAVHTTGDLLRPLQLVKTAPGTSVSVSTFIMEVNPCEYDNGVLLFADCAVNPCP  
DSDQLASIAISTAETAKNLCGMDPKVAMLSFSTKGSAKHELVDKVRNAVEIAKKAKPDLSDGELQLDASIVEKVASLKAPGSEVAG  
KANVLVFPDLQAGNIGYKLVQRFAKADAIGPVQCQGFAPKINDLSRGCNSDDIVNVAVTAVQAQAQK\*

FIG. 33

Seq. ID 61: sequência de nucleotídeos de quinase de acetato/butirato de *C. autoethanogenum*:

ATGAAAATATTAGTAGTAACTGTGGAAGTTCATCTTTAAAATATCAACTTATTGATATGCAAGATGAAAGTGTGTAGCAA  
 GGGTCTTGAGAAAGAATAGGAATGGACGGTTCAATTTAACACACAAAAGTTAATGGAGAAAAGTTTGTACAGAGCAACCA  
 ATGGAAGACCACAAAGTTGCTATACAATTAGTATTAATGCTCTTGTAGATAAAAAACATGGTGAATAAAAAGCATGTCAGA  
 AATATCCGCTGTAGGACATAGAGTTTTGCACGGTGAAAGAAATATGCAGCATCCATTCTTATTGACGAAAATGTAATGAAA  
 GCAATAGAAGAATGTATCCCACTAGGACCACTACATAATCCAGCTAATATAATGGGAATAGATGCTTGAAAAAATTAATGCC  
 AAATACTCCAATGGTAGCAGTATTTGATACAGCATTTTCATCAGACAATGCCAGATTATGCTTATACTTATGCAATACCTTATGA  
 TATATCTGAAAAGTATGATATCAGAAAATATGGTTTCATGGAACCTTCTCATAGATTCGTTTCAATTGAAGCAGCTAAATTATT  
 AAAGAAAGATCCAAAAGATCTTAAGTTAATAACTTGTCAATTTAGGAAATGGAGCTAGCATATGTGCAGTAAACCAAGGAAAA  
 GCAGTAGATACAACTATGGGACTTACTCCTCTTGCAGGACTTGAATGGGAACTAGATGCGGTGATATAGATCCAGCTATAGT  
 ACCATTTGTAATGAAAAGAACAGGCATGTCTGTAGATGAAGTGGATACCTTAATGAATAAAAAGTCAGGAATACTTGGAGTA  
 TCAGGAGTAAGCAGTGATTTTAGAGATGTAGAAGAAGCTGCAAATTCAGGAAATGATAGAGCAAACTTGCATTAATATGT  
 ATTATCACAAAGTTAAATCTTTCATAGGAGCTTATGTTGCAGTTTTAAATGGAGCAGATGCTATAATATTTACGGCAGGACTTG  
 GAGAAAATTCAGCAACTAGCAGATCTGCTATATGTAATGGATTAAGCTATTTTGGAAATAAAATAGATGAAGAAAAGAATAA  
 GAAAAGGGGAGAGGCCTAGAAAATAAGCACACCTGATTCAAAGATAAAAAGTATTAGTAATTCCTACAAATGAAGAACTTATG  
 ATAGCTAGGGATACAAAAGAAATAGTTGAAAATAAATAA

Seq. ID 62: sequência de aminoácidos de quinase de acetato/butirato de *C. autoethanogenum*:

MKILVNCSSSLKYQLIDMQDESVAKGLVERIGMDGSILTHKVNGEKVFTEQPMEDHKVAIQLVLNALVDKKHGVIKDMSEISA  
 VGHRVLHGGKYYAASILIDENVMKAIEEICPLGPLHNPANIMGIDACKKLMNPMPVAVFDTAHFQTMPDYAYTYAIPYDISEKYDI  
 RKYGFHGTSHRFVSIEAAKLLKDPKDLKLITCHLNGASICAVNQKAVDVTMGLTPLAGLVMGTRCGDIDPAIVPFVMKRTGMS  
 VDEVDLTMNKKSGILVSGVSSDFRDVEEAANSNDRAKLALNMYHVKVKSFIGAYVAVLNGADAIIFTAGLGENSATSRSAICNG  
 LSYFGIKIDEENKRRGEALEISTPDSKIKVLVIPTNEELMIARDTKEIVENK\*

FIG. 34

Seq. ID 63: sequência de nucleotídeos de óxido-redutase de aldeído:ferredoxina de *C. autoethanogenum*:

GTGGAAGAATTGAAAATTGACAAAGCTAAAAATTTATAGGTGCAAGAGGGTTAGGCGTAAAAACCTTATTTGACGAAGTA  
 GATCCAAAGGTAGATCCATTATCACCTGATAACAAATTTATTATAGCAGCGGGACCACCTTACAGGTGCACCTGTTCCAACAAG  
 CGGAAGATTCATGGTAGTTACTAAATCACCTTTAACAGGAACTATTGCTATTGCAAATTCAGGTGGAAAATGGGGAGCAGAA  
 TTCAAAGCAGCTGGATACGATATGATAATCGTTGAAGGTAATCTGATAAAGAAGTTTATGTAATATAGTAGATGATAAAG  
 TAGAATTTAGGGATGCTTCTCATGTTTGGGGAAAACCTAACAGAAGAACTACAAAAATGCTTCAACAGGAAACAGATTCGAG  
 AGCTAAGGTTTTATGCATAGGACCAGCTGGGGAAAAGTTATCACTTATGGCAGCAGTTATGAATGATGTTGATAGAACAGCA  
 GGACGTGGTGGTGGGAGCTGTTATGGGTTCAAAGAAGCTTAAAAGCTATTGTAGTTAAAGGAAGCGGAAAAGTAAAATTA  
 TTTGATGAACAAAAAGTGAAGGAAGTAGCACTTGAGAAAACAAATATTTTAAAGAAAAGATCCAGTAGCTGGTGGAGGACTTC  
 CAACATACGGAACAGCTGACTTGTAAATATTATAAATGAAAATGGTGTACATCCAGTAAAGAATTTTCAAAAAATCTTATACA  
 GATCAAGCAGATAAGATCAGTGGAGAACTTTAACTAAAGATTGCTTAGTTAGAAAAATCCTTGTATAGGTGTCCAATTGC  
 CTGTGGAAGATGGGTTAAAAGCTTATGATGGAAGTGAATGTGGAGGACCAGAAATATGAAACATTATGGTCAATTTGGATCTGAT  
 TGTGATGTATACGATATAAATGCTGTAATACAGCAATATGTTGTGAATGAATATGGACTAGATACCATTACAGCAGGATG  
 TACTATTGCAGCAGCTATGGAACCTTATCAAAGAGGTTATATTAAGGATGAAGAAATAGCAGCAGATGGATTGCACTTAATT  
 GGGGAGATGCTAAGTCCATGGTTGAATGGTAAAGAAAATGGGACTTAGAGAAGGATTGGAGACAAGATGGCAGATGGT  
 TCATACAGACTTTGTGACTCATACGGTGTACCTGAGTATCAATGACTGTAAAAAACAGGAACTTCCAGCATATGACCCAAG  
 AGGAATACAGGGACATGGCATTACTTATGCTGTTAAACAATAGGGGAGGATGTACATTAAGGGATATATGGTAAGTCCTGAA  
 ATACTTGGCTATCCAGAAAACTTGATAGACTTGCAGTGAAGGAAAAGCAGGATATGCTAGAGTATTCCATGATTTAACAG  
 CTGTTATAGATTCACTTGGATTATGTATTTTACAACATTTGGTCTTGGTGCACAGGATTATGTTGATATGTATAATGCAGTAG  
 TTGGTGGAGAATTACATGATGTAATTTCTTAAATGTTAGCTGGAGATAGAATATGGACTTTAGAAAAATTTAACTTAAAA  
 GCAGGCATAGATAGTTCACAGGATACTTCCAAAGAGATTGCTTGAAGAACAATTCAGAAGGACCATCAAAGGAGAA  
 GTTCATAAGTTAGATGTACTACTCTGAATATTATTAGTACGTGGATGGGATAAAAAATGGTATTCTACAGAGGAAACGTT  
 AAAGAAATTAGGATTAGATGAATACGTAGGTAAGCTTTAG

Seq. ID 64: sequência de aminoácidos de óxido-redutase de aldeído:ferredoxina de *C. autoethanogenum*:

MEELKIDKAKKFIGARGLGVKTLFDEVDPKVDPLSPDNKFIIAAGPLTGAPVPTSGRFMVVTKSPLTGTIAIANSQGWGAEFKAAG  
 YDMIIVEGKSDKEVYVNIIVDDKVEFRDASHVWGKLTETTKMLQQUETDSRAKVLICIGPAGEKLSLMAAVMNDVDRTAGRGGVGA  
 VMGSKNLKAIIVKSGSKVKLFDEQKVKEVALEKTNILRKDPVAGGGLPTYGTAVLVNIIENGVHPVKNFQKSYTDQADKISGETLT  
 KDCLVRKNPCYRCPACGRWVKLDDGTECGGPEYETLWSFGSDCDVVDINAVNTANMLCNEYGLDTITAGCTIAAAMELYQRGYI  
 KDEEIAADGLSLNWGDAKSMVEWVKMGLREGFGDKMADGSYRLCDSYGVPEYSMTVKKQELPAYDPRGIQGHGITYAVNNR  
 GGCHIKGYMVSPEILGYPEKLDRLAVEGKAGYARVFDLTAVIDSLGLCIFTTFGLGAQDYVDMYNAVVGELHDVNSLMLAGDRI  
 WTLEKIFNLKAGIDSSQDTLPKRLLLEQIPEGPSKGEVHKLDVLLPEYYSVRGWKNGIPTTEETLKKLGLDEYVGKL\*

FIG. 35

Seq. ID 65: sequência de nucleotídeos de óxido-redutase de aldeído:ferredoxina de *C. autoethanogenum*:

ATGTATGGTTATGATGGTAAAGTATTAAGAATTAATTTAAAAGAAAGAACTTGCAAATCAGAAAATTTAGATTTA  
 GATAAAGCTAAAAAGTTTATAGGTTGTAGGGGACTAGGTGTTAAACTTTATTTGATGAAATAGATCCTAAAATA  
 GATGCATTATCACCAGAAAATAAATTTATAATTGTAACAGGTCCTTAACTGGAGCTCCGGTCCAAGTGGAA  
 GGTTTATGGTAGTTACTAAAGCACCGCTTACAGGAACTATAGGAATTTCAAATTCGGGTGGAAAATGGGGAGTA  
 GACTTAAAAAAGCTGGTTGGGATATGATAATAGTAGAGGATAAGGCTGATCACCAGTTTACATTGAAATAGTA  
 GATGATAAGGTAGAAAATTAAGACGCGTCACAGCTTTGGGGAAAAGTTACATCAGAACTACAAAAGAGTTAGA  
 AAAGATAACTGAGAATAAATCAAAGGTATTATGTATAGGACCTGCTGGTGAACGATTGTCTTATGGCAGCAGT  
 TATGAATGATGTAGATAGAACTGCAGCAAGAGGCGGCGTTGGTGCAGTTATGGGATCTAAAACTTAAAAGCTA  
 TTACAGTTAAAGGAACTGGAAAATAGCTTTAGCTGATAAAGAAAAAGTAAAAAAGTGTCCGTAGAAAAAATT  
 ACAACATTAAAAAATGATCCAGTAGCTGGTCAGGGAATGCCAAGTTATGGTACAGCTATACTGGTTAATATAATA  
 AATGAAAATGGAGTTCATCCTGTAAGAATTTCAAGAGTCTTATACGAATCAAGCAGATAAAATAAGTGGAGAG  
 ACTCTTACTGCTAACCAACTAGTAAGGAAAAATCCTTGTACAGCTGTCTATAGGTTGTGGAAGATGGGTTAGA  
 CTAAAAGATGGCACAGAGTGCAGGAGGACCAGAAATGAAACACTGTGGTGTGTTGGATCTGACTGTGGTTCATA  
 TGATTTAGATGCTATAAATGAAGCTAATATGTTATGTAATGAATATGGTATTGATACTATTACTTGTGGTGCAACA  
 ATTGCTGCAGCTATGGAATTTATCAAAGAGGATATATAAAGACGAAGAAATAGCTGGAGATAACCTATCTCTC  
 AAGTGGGGTGATACGGAATCTATGATTGGCTGGATAAAGAGAATGGTATATAGTGAAGGCTTTGGAGCAAAGA  
 TGACAAATGGTTCATATAGGCTTTGTGAAGTTATGGAGCACCGGAGTATTCTATGACAGTTAAAAAGCAGGAA  
 ATTCCAGCATATGATCCAAGGGGAATACAGGGACACGGTATTACCTATGCAGTTAATAATAGAGGAGGCTGTCA  
 TATTAAGGGATACATGATTAACCTGAAATATTAGGTTATCCTGAAAACTTGATAGATTTGCATTAGATGGTAAA  
 GCAGCTTATGCCAAATTTTATGATTTAACTGCTGTAATTGATTCTTATAGGATTGTGCATATCACTACATTTGG  
 GCTTGGAAATACAGGATTATGTAGATATGTATAATGCAGTAGTAGGAGAATCTACTTATGATGCAGATCACTATT  
 AGAGGCAGGAGATAGAATCTGGACTCTTGAGAAATTTAATCTTGCAGCTGGAATAGACAGCAGCCAGGATA  
 CTCTACCAAAGAGATTGTTAGAAGAACCTATTCCAGATGGCCATCAAAGGGAGAAGTTCATAGGCTAGATGTTT  
 TTCTGCCAGAATATACTCAGTACGAGGATGGAGTAAAGAGGGTATACCTACAGAAGAAACATTAAGAAATTA  
 GGATTAGATGAATATATAGGTAAGTTCTAG

Seq. ID 66: sequência de aminoácidos de óxido-redutase de aldeído:ferredoxina de *C. autoethanogenum*:

MYGYDGKVLRLINLKERTCKSENLDLKDAKKFIGCRGLGVKTLFDEIDPKIDALSPENKFIIVTGPLTGAPVPTSGRFMVVT  
 KAPLTGTIGISNSGGKWGVDLKAGWDMIIVEDKADSPVYIEIVDDKVEIKDASQLWGVKVTSETTKELEKITENKSKVLC  
 IGPAGERLSLMAAVMNDVDRTAARGGVGAVMGSKNLKAITVKGTKIALADKEKVKVSVKITTAKNDPVGQGM  
 PTYGTAILVNIINENGVHPVKNFQESYTNQADKISGETLTANQLVRKNPCYSCPIGCRWVRLKDGTECGGPEYETLW  
 CFGSDCGSYDLDAINEANMLCNEYGIDTITCGATIAAAMELYQRGYIKDEEIAAGDNLSLKWGDTESMIGWIKRMVYSE  
 GFGAKMTNGSYRLCEGYGAPEYSMTVKKQEI PAYDPRGIQGHGITYAVNNRGGCHIKGYMINPEILGYPEKLRDFALD  
 GKAAYAKLFHDLTAVIDSLGLCIFTFGLGIQDYVDMYNAVVGESTYDADSLLEAGDRIWTLEKLFNLAAGIDSSQDTLP  
 KRLLPEIPDGP SKGEVHRLDVLLPEYYSVRGWSKEGIPTEETLKKLGLDEYIGKF\*

FIG. 36

Seq. ID 67: sequência de nucleotídeos de desidrogenase de butanol/butiraldeído bifuncional de *C. ljungdahlii*:

ATGAAGGTAAC TAAGGTAAC TAACGTTGAAGAATTAATGAAAAAGTTAGATGAAGTAACGGCTGCTCAAAAGAAATTTCTA  
 GCTATACTCAAGAACAAGTGGATGAAATTTTCAGGCAGGCAGCTATGGCAGCCAATAGTGCTAGAATAGACTTAGCTAAAAT  
 GGCAGTGAAGAAAAGCGGAATGGGAATTGTAGAAGACAAGGTCATTAATAATCAATTTGTTGAGAGTATATATAACAA  
 ATATAAGGGTGA AAAAACCTGTGGAGTTCTGGAAACAAGATGAAGGCTTTGGTATGGTTAGAATTGCAGAACCTGTAGGAGT  
 TATTGCAGCAGTAGTCCCAACAATACTCAACATCTACAGCAATATTTAAATCACTAATAGCTTTAAAAAACTAGAAATGGTAT  
 AGTTTTTTCGCCACATCCAAGGGCAAAAAAATCAACTATTGCAGCAGCTAAGATAGTACTTGATGCTGCAGTTAAAGCTGGTG  
 CTCCTGAAGGAATTATAGGATGGATAGATGAACCTCTATTGAACCTTCACAGGTGGTAATGAAAGAAGCAGATCTAATCTT  
 GCAACTGGTGGACAGGTATGGTTAAGGCTGCCTATTCTTCAGGAAAGCCTGCTATAGGAGTTGGTCCAGGTAACACGCCTG  
 CTGTAATTGATGAAAGTGCTGACATTAATAATGGCAGTAAATCAATACTATTATCAAAAACTTTTGATAATGGTATGATTTGTG  
 CTTAGAGCAGTCAGTAGTAGTTGCAAGCTCAATATACGATGAAGTCAAGAAAAGAGTTTGAGATAGAGGAGCATATATATT  
 AAGTAAGGATGAAACAGAGAAGGTTGGAAAAACAATTATAATTAATGGAGCCTTAAATGCTGGCATTGTAGGGCAAAGTGC  
 TTTTAAAATAGCACAGATGGCAGGAGTGAGTGTACCAGAAGATGCTAAAGTACTTATAGGAGAAGTTAAATCAGTAGAACCG  
 GAAGAAGAGCCCTTTGCGCATGAAAAGCTATCTCCAGTTTTAGCTATGTACAAAGCAAAAGATTTTGACGAAGCACTCCTAAA  
 GGCTGGAAGATTAGTTGAACGAGGTGGAATTGGGCATACATCTGTATTATGTAAATGCAATGACGGA AAAAGTAAAGGT  
 AGAAAAGTTCAGAGAACTATGAAGACTGGTAGAACATTGATAAATATGCCTTCAGCAAGGTGCTATAGGAGATATATAT  
 AACTTTAAGCTAGCTCCTTTGACACTAGGTTGTGGTTCTGGGGAGGAAACTCTGTATCAGAAAATGTTGGTCTCTAAACA  
 TTTATTAACATAAAGAGTGTTGCTGAGAGGAGAGAAAATATGCTTTGGTTAGAGTACCTGAAAAGGTTTATTTCAAATATG  
 GTAGTCTTGGAGTTGCACTAAAAGAACTGAGAATTATGGAGAAGAAAAGGCATTTATAGTAACGGATAAAGTTCTTTATCA  
 ATTAGTTATGTAGATAAAAATTACAAAAAATCTGGATGAATTAAGAGTTTCATATAAAAATTTTACAGATGTAGAACCAGATC  
 CAACCTTGCTACAGCTAAAAAAGGTGCAGCAGAAGTGTAGCTTATGAACAGATACAATTATAGCAGTCGGTGGTGGTTC  
 AGCAATGGATGCAGCCAAGATCATGTGGTAATGTATGAGCATCCAGAAGTAAGATTTGAAGATTTAGCTATGAGATTTATG  
 GATATAAGAAAAGAGAGTGATGTTTTCCCTAAAATGGGAGAAAAGGCAATGATGATTTGAGTACCAATCCGCAGGAACA  
 GGGTCGGAAGTTACGCCATTTGCAAGTAATTACGGATGAAAGAACAGGAGCTAAATATCCTCTGGCTGATTATGAATTGACTC  
 CAAACATGGCTATAGTTGATGCAGAACTTATGATGGGAATGCCAAAGGGACTAACAGCAGCTTCAGGTATAGATGCATTAAC  
 CCATGCGCTGGAGGCTTATGATCAATAATGGCTTCAGAAATATACCAATGGATTGGCTCTTGAAGCAACAAGATTAGTATTTA  
 AATATTTGCCAATAGCTTATACAGAAGGTACAATAATGTAAGGCAAGAGAAAAAATGGCTCATGCTTATGATTGCAGGT  
 ATGGCCTTTGCCAATGCATTTTTAGGGGTATGCCACTCCATGGCACATAAATGGGAGCACAGCACCACATACCACATGGAAT  
 TGCCAATGCATTATGATAGATGAAGTTATAAAGTTCAATGCTGTAGAGGCTCCAAGGAAACAAGCGGATTTCCACAATATA  
 AATATCCAATGTTAAAAGAAGATATGCTAGAATAGCTGATTACTTAAATTTAGGTTGGAAGTACAGATGATGAAAAAGTACA  
 ATTTTAATAAATGCTATAGATGACTTGAAAACCAAGTTAAATATTTCAAAGACTATTAAGAAGCGGGAGTTTCAGAAGATA  
 AATTCTATGCTACTTTAGATACAATGTCAGAAGTGGCTTTGATGATCAATGTACAGGAGCTAATCCAAGATATCCATTAATAG  
 GAGAAATAAAACAAATGTATATAAATGCATTTGATACACCAAGGCAACTGTGGAGAAGAAAACAAGAAAGAAAAAATAA

FIG. 37

Seq. ID 68: sequência de aminoácidos de desidrogenase de butanol/butiraldeído bifuncional de *C. ljungdahlii*:

MKVTKVTNVEELMKKLDEVTAQAQKFSSTYQEQVDEIFRQAAMAANSARIDLAKMAVEESGMGIVEDKVIKHFVAEYIYNKYKG  
 EKTGCVLEQDEGFMVRIAEPVGVIAAVVPTTNPSTAIKSLIALKTRNGIVFSPHPRAKKSTIAAAKIVLDAAVKAGAPEGIIGWID  
 EPSIELSQVVMKEADLILATGGPGMVKAAYSSGKPAIGVGPNTPAVIDESADIKMAVNSILLSKTFDNGMICASEQSVVASSIYD  
 EVKKEFADRGAYILSKDETEKVGKTIINGALNAGIVGQSAFKIAQMAGVSVPEDAKVLIGEVKSVPEEPFAHEKLSPLVAMYKAK  
 DFDEALLKAGRLVERGGIGHTSVLYVNAMTEKVKVEKFRMETMKTGRITLINMPSAQGAIGDIYNFKLAPSLTLGCGSWGGNSVSEN  
 VGPKHLNLIKVAERRENMLWFRVPEKVFYKGLGVALKELRIMEKKAFIVTDKLVLYQLGYVDKITKNLDELRSYKIFTDVDPDPT  
 LATAKKGAAELAYEPDTIIAVGGGSAMDAAKIMWVMEYHEPVRFDLAMRFMDIRKRVYVFPKMGEEKAMMISVATSAGTGSE  
 VTPFAVITDERTGAKYPLADYELTPNMAIVDAELMMGMPKGLTAASGIDALTHALEAVYSIMASEYTNGLALEATRLVFKYLPYAT  
 EGTNVKAREKMAHASCAGMAFANAFLGVCHSMAHKLGAQHHPHIGIANALMIDEVIKFNVAEAPRKQAAFPQYKYPNVKRRY  
 ARIADYLN LGSTDEKVVQLINAIDDLKTLNIPKTIKEAGVSEDKFYATLDTMSELAFFDDQCTGANPRYPLIGEIKQMYINAFDTPK  
 ATVEKKTRKKK\*

FIG. 38



Seq. ID 69: sequência de nucleotídeos de desidrogenase de butanol/butiraldeído bifuncional de *C. ljungdahlii*:

ATGAAAGTTACAAACGTAGAAGAACTAATGAAAAGACTAGAAGAAATAAAGGATGCTCAAAAGAAATTTGCTACATATACT  
 AAGAACAAGTGGATGAAATTTTAGACAAGCAGCTATGGCAGCTAATAGTCTAGAATAGAAGTAACTAGCTAAAATGGCAGTAG  
 AAGAAAGCGGAATGGGAATTGTAGAAGACAAGGTCATTAATAATCACTTTGCCTCAGAATATATATAACAAATATAAGGA  
 TGAAAAAACCTGTGGAGTTTATAGAGAGAGATGCAGGATTTGGTATAGTTAGAATTGCGGAACCTGTAGGAGTTATCGCAGCA  
 GTAGTTCCAACAATAATCCAACATCTACAGCAATATTTAAATCACTAATAGCTTTAAAACTAGAAAATGGTATAATTTTTTAC  
 CCCATCCAAGGGCAAAGAAATCAACTATTGCAGCAGCTAAAATAGTACTTGACGCTGCAGTTAAAGCTGGTGCCTGCTGAAGG  
 AATTATAGGATGGATAGATGAACCTCCATTGAACTTTACAGGTGGTAATGGGAGAAAGCAAATTTAATCTTGCAACTGGTG  
 GCCCGGTATGGTTAAGGCTGCCTATTCTTCAGGCAAACCTGCTGTGGGAGTTGGTCCAGGTAACACACCTGCTGTAATTGAT  
 GAAAGTGCCGACATTAATAAGGCAAGTAAATTTCAATATTAATCAAGACTTTTGATAATGGTATGATTTGTGCCTCAGAGCA  
 GTCAGTAATAGTTTTAGACTCAATATATGAGGAAGTTAAAAAAGAATTTGCTTATAGGGGTGCTTATATTAAGTAAGGATG  
 AAACAGATAAGGTTGGAAAAATAATTTAAAAAATGGAGCCTTAAATGCAGGTATTGTAGGACAACCTGCTTTAAAAATAGC  
 ACAGCTGGCAGGAGTGGATGTACCAGAAAAAGCTAAAGTACTTATAGGAGAGGTAGAATCGGTAGAAGTGAAGAACCTATT  
 TTCTCATGAAAAGTTATCTCCAGTTTTAGCTATGTACAGGGCAAGAAATTTGAGGATGCCATTGCAAAAACTGATAAACTGG  
 TTAGGTCAGGTGGATTTGGACATACATCTTCATTATATGTAATCCAATGCAGAGAAAGCAAAGTAGAAAAATTTAGTACT  
 ATGATGAAAACATCAAGAACTATAATTAACACACCTTCATCCCAAGGTGGTATAGGTGATATATAACTTTAACTAGCTCCT  
 TCTTTGACATTAGGCTCGGTTCTGGGGAGGAAATCTGTATCCGAAAATGTTGGGCCTAAACATTTATAAACATAAAAAAG  
 TGTTGCTGAGAGGAGAGAAAAATGCTTTGGTTTAGAGTACCTGAAAAGGTTTATTTCAAATATGGTAGTCTTGGAGTTGCAT  
 TAAAAAATTAAGTTATGAATAAGAAGAAAGTATTTATAGTAACAGATAAAGTTCTTTATCAATTAGGTTATGTGGACAAA  
 GTTACAAAAGTTCTTGAGGAACTAAAAATTTCTATAAGGTATTTACAGATGTAGAACCAGATCCAACCCTTGCTACAGCTAA  
 AAAAGTGCAGCAGAACTGCTTTCTATGAACCGGATACAAATATATCAGTTGGTGGTGGCTCAGCAATGGATGCAGCTAAG  
 ATCATGTGGTAATGTATGAGCATCCAGAAGTAAAATTTGAAGATTTAGCTATGAGATTTATGGATATAAGAAAGAGAGTAT  
 ATGTTTTCCCTAAGATGGGAGAAAAGGCAATGATGATTTAGTAGCAACATCCGAGGAACAGGGTCGGAAGTTACTCCATT  
 TGCAGTAATCACTGATGAAAAACAGGAGCTAAATATCCATTAGCTGATTATGAACTAACTCCAGACATGGCTATAGTTGATG  
 CAGAAGTTATGATGGGAATGCCAAGAGGACTTACAGCAGCTTCGGGTATAGATGCATTAACCCATGCACTGGAGGCATATGT  
 GTCATAATGGCTACAGAAATTTACCAATGGATTAGCCCTTGAAGCAGTAAAGTTGATATTTGAATTTACAAAAGCTTATA  
 CAGAAGTACAATAATGTAAGGCAAGAGAAAAGATGGTTCATGCTTCATGTATTGCAGGTATGGCCTTTGCAAATGCATT  
 TTTAGGGGTATGCCACTCTATGGCACATAAATTTGGGAGCACAGCATCACATACCACATGGAATTGCAATGCACTTATGATAG  
 AGATATGCTCAGATAGCTGATTGTCTGAACTTGGGAGGAAATACAGAAGAGGAAAAGGTACAACATTAATAAATGCTATAG  
 ATGATTTAAAAGCTAAGTTAAATATTCCAGAACTATAAAGAAGCAGGAGTTTCAGAAGATAAATCTATGCTACTTTAGAT  
 AAAATGTCAGAATTAGCTTTTGTATGATCAGTGTACAGGAGCTAATCCAAGATATCCACTGATAAGTGAATAAAAACAAATGTA  
 TATAATGTTTTTATGATAAACCGAACCAATTGTAGAAGATGAAGAAAAGTAA

FIG. 39

Seq. ID 70: sequência de aminoácidos de desidrogenase de butanol/butiraldeído bifuncional de *C. ljungdahlii*:

MKVTNVEELMKRLEEIKDAQKFFATYTYEQVDEIFRQAAMAANSARIELAKMAVEESGMGIVEDKVIKNIHFASEYIYN  
 KYKDEKTCGVLERDAGFGIVRIAEPVGVIAAVVPTTNPSTAIKSLIALKTRNGIIFSPHPRAKKSTIAAAKIVLDAAVKAG  
 APEGIIGWIDEPSIELSQVVMGEANLILATGGPGMVKAAAYSSGKPAVGVGPGNTPAVIDESADIKMAVNSILLSKTFDN  
 GMICASEQSVIVLDSIYEEVKKEFAYRGAYILSKDETDKVGKIILKNGALNAGIVGQPAFKIAQLAGVDVPEKAKVLIGEV  
 ESVELEEPSHEKLSPLAMYRARNFEDAIKTDKLVRSGGFGHTSSLYVNPMTAKAKVEKFSTMMKTSRTIINTPSSQ  
 GGIGDIYNFKLAPSLTLGCGSWGGSVSENVGPKHLLNIKVAERRENMLWFRVPEKVYFKYGLGVALKELKVMNKK  
 KVFIVTDKVLVYQLGYVDKVTKVLLEELKISYKVFVDVEPDPTLATAKKGAAELLSYEPDIIISVGGGSAMDAAKIMWVMY  
 EHPEVKFEDLAMRFMDIRKRVYVFPKMGEKAMMISVATSAGTGSEVTPFAVITDEKTGAKYPLADYELTPDMAIVDA  
 ELMMGMPRGLTAASGIDALTHALEAYVSIMATEFTNGLALEAVKLIFEYLPKAYTEGTTNVKAREKMHASCIAGMAF  
 ANAFLGVCHSMAHKLGAQHHPHGIANALMIDEVIKFNVAVDDPIKQAAFPQYEPNARYRYAQIADCLNLGGNTEEE  
 KVQLLINAIDDLKAKLNIPETIKEAGVSEDKFYATLDKMSLAFDDQCTGANPRYPLISEIKQMYINVFDKTEPIVEDEEK\*

Seq. ID 71: sequência de nucleotídeos de desidrogenase de butiraldeído de *C. ljungdahlii*:

TTGGAAAATTTGATAAAGACTTACGTTCTATACAAGAAGCAAGAGATCTTGACGTTTAGGAAAAATTCAGCA  
 GACCAAATTGCTGATTATACTGAAGAACAATTGATAAAATCCTATGTAATATGGTTAGGGTAGCAGAAGAAAAAT  
 GCAGTTTGCCTTGGTAAAATGGCTGCAGAAGAACTGGTTTTGGAAAAGCTGAAGATAAGGCTTATAAGAACCA  
 TAGGGTCTACTACAGTATATAATTACATCAAGGATATGAAGACTATTGGTGTATAAAAAGAAGATAAAAGTGA  
 AGTGTAATTAATTTGCAGAACCAGTTGGTTTATTAATGGGTATTGTACCCTACAAAATCCAACATCTACTGTT  
 ATTTATAAATCAATCATTGCAATTAATCAAGAAATGCAATTGTATTCTACCCACACCCAGCTGCATTAATGTT  
 AACAAAAGCAATAGAACTTATGCGTGATGCAGCAGTAGCAGCAGGAGCTCCTGCAAATGTAATTGGTGGTATTG  
 TTACACCATCTATAAAGCTACAAAATGAACCTTATGAAAGCTAAAGAAGTTGCTATGATAATTGCAACTGGAGGCC  
 CTGGAATGGTAAAGGCTGCATATAGTTCAGGAACACCTGCAATAGGCGTTGGTGCTGGTAACTCTCCATCCTATA  
 TTGAAAGAAGCTGCTGATGTTTCAATCAGTTAAAGATATAATAGCTAGTAAGAGTTTACTACTATTTG  
 TGCATCCGAGCAGTCTGTAATTGCAGAAGAATGCAACCATGATGAAATAGTAGCTGAATTAAGAAAACAAGGCG  
 GATATTTTATGACAGCTGAAGAAACTGCAAAAGTTTGCAGCGTACTTTTTAAACCTGGTACACACAGCATGAGCG  
 CTAAGTTTGTAGGAAGAGCTCCTCAGGTTATAGCAGAAGCTGCAGGTTTACAGTTCCAGAAGGAACAAAAGTA  
 TTAATAGGAGAACAAGGCGGAGTTGGTAATGGTTACCCTCTATCTTATGAGAACTTACAACAGTACTTGTCTTCT  
 ATACAGTTAAAGATTGGCATGAAGCATGTGAGCTTAGTATAAGATTACTTCAAAATGGTCTTGGACATACAATGA  
 ACATTCATACAAATGATAGAGACTTAGTAATGAAGTTTGTAAAAAACCAGCATCCCGTATCTTAGTTAATACTGG  
 TGGAAGCCAGGGAGGTAAGTGGTCAAGCACAGGATTAGCACCTGCATTTACATTAGGTTGTGGTACATGGGGAG  
 GAAGCTCTGTTTCTGAAAATGTTACTCCATTACATTTAATCAATATAAAGAGAGTAGCATATGGTCTTAAAGATTG  
 TACTACATTAGCTGCAGACGATACAACTTTCAATCATCCTGAACCTTTCGGAAGCAAAAATGACTTAGGATTCTGT  
 GCTACAAGCCCTGCAGAATTTGCAGCAAAGAGCAATTTGTATAGCACTGCTGCAGATACTACTGATAATGATAAA  
 CTTGCTAGACTCGTAAGTGAATTAGTAGCTGCAATGAAGGGAGCTAACTAA

FIG. 40

Seq. ID 72: sequência de aminoácidos de desidrogenase de butiraldeído de *C. ljungdahlii*:

MENFDKDLRSIQEARLRLGKIAADQIADYTEEQDKILCNMVRVAEENAVCLGKMAAEEETGFGKAEDKAYKNHMA  
 ATTVYNYIKDMKTIGVIKEDKSEGVIEFAEPVGLLMGIVPSTNPTSTVIYKSIHAIKSRNAIVFSPHPAALKCSTKAIELMRD  
 AAVAAGAPANVIGGIVTPSIQATNELMKAKEVAMIIATGGPGMVKAAYSSGTPAIGVGAGNSPSYIERTADVHQSVK  
 DIIASKSFDYGTICASEQSVIAEECNHDEIVAIEFKKQGGYFMTAEETAKVCSVLFKPGTHSMSAKFVGRAPQVIAEAAGF  
 TVPEGTKVLIGEQQGGVNGYPLSYEKLTTVLAFYTVKDWHEACELSIRLLQNLGHTMNIHTNDRDLVMKFAKPPASR  
 ILVNTGGSQGGTGASTGLAPAFTLGCCTWGGSSVSENVTPHLINIKRVAYGLKDCCTLAADDTTFNHPELCSKNDL  
 GFCATSPAFAAKSNCDSTAADTTDNDKLARLVSELVAAMKGAN

Seq. ID 73: sequência de nucleotídeos de desidrogenase de butiraldeído de *C. ljungdahlii*:

ATGAATATTATTGATAATGATTTGCTCTCCATCCAAGAATCCCGAATCCTTGTGGAAAATGCTGCACGAGCACAAA  
 AAATGTTAGCAACCTTTCCACAAGAAAAGCTAGATGAGATTGTTGAACGTATGGCGGAAGAAATCGGAAAACAT  
 ACCCGAGAGCTTGTGTAATGTCACAGGATGAACTGGTTATGGAAAATGGCAGGATAAATGCATCAAAAACCG  
 ATTTGCCCTGTGAGTATTGCCAGCTAAGCTTAGAGGAATGCGATGTGTAGGTATTATTAATGAAAATGGTCAGGA  
 TAAGACCATGGATGTAGGTGTACCTATGGGTGTAATTATTGCATTATGTCCTGCAACTAGTCCGGTTTCTACTACC  
 ATATATAAGGCATTGATTGCAATTAAGTCTGGTAATGCAATTATCTTTTCTCCACATCCTAGAGCAAAGGAGACAA  
 TTTGTAAGGCGCTTGACATCATGATTCGTGCAGCTGAAGGATATGGGCTTCCAGAAGGAGCTCTTGCATACTTAC  
 ATACTGTGACGCTAGTGGAAACAATCGAATTGATGAACCATATTGCGACTCTTTGATTATGAATACAGGTGTTCC  
 CGGGATGCTTAAAGCAGCATATAATTCTGGGAAACCTGTTATATATGGAGGAACTGGTAATGGACCAGCATTAT  
 TGAACGTACAGCTGACATCAAACAGGCGGTAAAAGATATTATTGCTAGTAAGACCTTTGATAACGGAATAGTACC  
 ATCAGCTGAACAATCTATTGTTGTAGATAGCTGTGTTGCATCTGATGTTAAACGTGAGTTGCAAAAATAATGGTGC  
 ATATTTTATGACAGAGGAGGAAGCACAAAAACTAGGTTCTCTCTTTTCCGTTCTGATGGCAGTATGGATTGAGA  
 AATGGTTGGCAAATCCGCACAAAGATTGGCTAAAAAAGCAGGTTTTCAGCATTCTGAAAGTAGCACAGTGCTAAT  
 TTCAGAGCAGAAAATGTTTCTCAAGATAATCCTTATTCCAAGGAGAACTTTGTCCGGTACTAGCTTACTACATT  
 GAAGATGATTGGATGCATGCATGTGAAAAGTGATTGAACTGCTGTTAAGTGAGAGACATGGTCACACTCTTGTT  
 ATACATTCAAAAGACGAAGATGTAATTCGCCAGTTTGCATTAAAAAAACCTGTAGGTAGGATACTTGTTAATACG  
 CCTGCTTCTTTGGTAGTATGGGTGCTACAAGTAATTTTCTGCTTAACTTTAGGTAGTGGATCGGCAGGTA  
 AAGGTATTACCTCCGATAATGTTCCACCAATGAATCTTATTTACGTCGCAAAGTCGGATATGGCGTACGGAATGT  
 AGAAGAGATTGTCAATACTAATGGATTGTTTACAGAAGAAAAAGTGATTTGAATGGAATGACAAAAAAGTCAG  
 ACTATAATCCAGAGGATATACAAATGTTACAGCATATTTAAAAAAGCTATGGAAAAAATTAATAG

Seq. ID 74: sequência de aminoácidos de desidrogenase de butiraldeído de *C. ljungdahlii*

MNIIDNDLLSIQESRILVENAARAQKMLATFPQEKLEIVERMAEEIGKHTRELAVMSQDETGYGKWQDKCIKNRFAC  
 EYLPKLRGMRCVGIINENGQDKTMDVGVPMGVIIALCPATSPVSTTIYKALIAIKSGNAIIFSPHPRAKETICKALDIMIR  
 AAEGYGLPEGALAYLHTVTPSGTIELMNIHATSLIMNTGVPGMMLKAAYNNSGKPVYGGTGNPFIERTADIKQAVKDI  
 IASKTFDNGVIPSAEQSIIVDSCVASDVKRELQNNGAYFMTEEEAQKLGSLFFRSDGSMSEMVMGKSAQRLAKKAGFS  
 IPESSTVLISEQKYVSDNPYSKEKLCPLVAYYIEDDWMHACEKCIELLSERHGHTLVIHKSDEDEVIRQFALKKPVGRILV  
 NTPASFGSMGATSNFLPALTLGSGSAGKGITSDNVSPMNIYVRKVGYGVRNVEEIVNTNGLFTEESDLNMGMTKKSD  
 YNPEDIQMLQHLKAMEKIK\*

FIG. 41

Seq. ID 75: sequência de nucleotídeos de desidrogenase de butanol de *C. ljungdahlii*

ATGGCAAGATTTACTTTACCAAGAGACATTTATTTTGGAGAAAATTCATTAGAAACCTTGAAAGACCTAGATGGA  
 AAAAAAGCTGTTATTGTCGTAGGTGGTGGATCCATGAAACGATTTGGATTCCTTGATAAGGTAGTAACTACTTA  
 AAAGAAGCAGGTATTGAATCAAATTAATAGAAGGAGTTGAACCAGATCCATCTGTAGAACTGTTATGAATGG  
 CGCTAAACTAATGAGAGAATATGAACCAGATTTAATAGTATCAATAGGTGGAGGTTACCAATTGACGCAGCAAA  
 AGCTATGTGGATATTCTATGAATACCCTGAGTTTACTTTTAAAGAGGCTGTGGTTCCTTTTGGTCTTCTAAATTA  
 GACAAAAAGCAACATTTATAGCTATACCTTCTACAAGTGGTACTGCAACAGAAGTAACGGCATTCTTCTGAATAAC  
 AGACTATAAAGCTAAAATTAATATCCTTTAGCTGACTTCAATTTAACACCAGATATAGCTATAATTGATCCAGCAT  
 TAGCTCAAACAATGCCACCTAAATTAAGTGCACATACTGGAATGGATGCACTTACCCATGCTATTGAAGCATATGT  
 TGCAGGACTTCATTGAGTTTCTCAGATCCTCTTGCTATTCAAGCTATAGTTATGGTAAATCAGTATTTAATTAAT  
 CTTACAATGAAGATAAAGAAGCTAGAAACCAATGCATTTAGCTCAATGTTTAGCTGGAATGGCATTCTTCAAATG  
 CACTTCTTGAATAACTCACAGTTTAGCACATAAACAGGTGCAGTATCCATATCCCTCATGGATGTGCCAATGC  
 AATATATCTTCTTATGTTATAGATTTCAATAAAAAAGCTTGTGCACCAAGATATGCTGAAATAGCTAGGAGTCTT  
 AAACCTCCAGGAAATACTGATGATGAATTAGTAGATTCATTAACCAACATGATTAAGATATGAATAAGAGTATG  
 GATATTCCTTTAACATTAAGATTACGGAGTAGATGAAAAAGAATTTAAAGATAGTGAAGATTTTATAGCTCAC  
 AATGCCGTATTAGATGCCTGCACTGGATCAAATCCTAGAAGTATAAATGATACTGAAATGAAAAAGTTATTAGAA  
 TACATCTATTATGGTAAAAAGGTTGATTTTAA

Seq. ID 76: sequência de aminoácidos de desidrogenase de butanol de *C. ljungdahlii*:

MARFTLPRDIYFGENSLETCLKDLGKKAVIVVGGGSMKRFGLDKVVNYLKEAGIESKLIQVEPDPVETVMNGAKL  
 MREYEPDLIVSIGGGSPIDAAKAMWIFYEYEFTEKEAVVPFGLPKLRQKATFIAIPSTSGTATEVTFASFVITDYKAKIKYP  
 LADFNLTPIAIIIDPALAQTMPPKLAHTGMDALTHAIEAYVAGLHVSFSDPLAIQAIMVNVNQLIKSYNEDKEARNQ  
 MHLAQCLAGMAFSNALLGITHSLAHTGAVFHIPHCANAIYLPYVIDFNKKACAPRYAEIARSLKLPGNDDDELVDL  
 TNMIKDMNKSMDIPLTLKDYGVDEKEFKDSEDFIAHNAVLDACGTSNPRSINDTEMKKLEYIYYGKKVDF\*

Seq. ID 77: sequência de nucleotídeos de desidrogenase de butanol de *C. ljungdahlii*:

ATGGGAAGATTTACTTTGCCTAGGGATTTACTTTGGTAAAATGCCTTAGAAAATTTAAAAATTTAGATGGA  
 AATAAAGCAGTAGTTGTTGAGGTGGGGGATCTATGAAGAGATTTGGATTCTTAGCCAAAGTTGAAAAACTACTTA  
 AAAGAACTGGTATGGAAGTTAAATTAATAGAAGGTGTTGAGCCTGATCCGCTGTTGATACTGTTATGAATGGC  
 GCTAAAATAATGAGAGACTTTAACCCAGATTGGATAGTATCAATAGGTGGAGGATCTCCCATAGATGCTGCTAAA  
 GCAATGTGGATATTTTATGAATACCCCGACTTTACATTTGAAAAAGCGGTAGTCCCTTTTGGAAATCTAAATTA  
 GGCAGAAGGCACAATTTGTTGCTATACCTTCTACAAGTGGAAACAGCAACTGAAGTAACATCATTTTCTGTAATAAC  
 AGACTATAAAGCTAAAATAAATATCCTCTTGAGATTTTAACTTACCCCTGATATAGCTATAATAGATCCGTCTC  
 TTGCAGAAAACAATGCCAAAAAGCTTACAGCACACACTGGAATGGATGCACTTACTCACGCAATAGAAGCATATG  
 TAGCAAGTTTACATTCAGATTTCTCAGATCCACTTGCTATGCATGCTATAACCATGATTCATAAATATTTATTGAAA  
 TCCTATGAAGAAGATAAAGAAGCTAGAGGACATATGCATATAGCCCAATGTCTAGCTGGGATGGCATTCTTCAAAT  
 GCTCTCCTTGGAAATAACTCATAGTATAGCACATAAACTGGTGCAGTATTTACATACCTCATGGGTGTGCTAATG  
 CCATATACTTACCTTATGTTATAGATTTTAAACAAGAAAGCTTGTTCAGAAAGATATGCTAAAATAGCCAAAAAGCT  
 GCATCTATCAGGAAATAGTGAAGATGAGCTAATAGATTCATTAAGTGAATGATTGCTACTATGAACAAAAAGAT  
 GGATATTCCTCTACCATAAAAGATTATGGTATAAGCGAAAAAGATTTTAAATGAAAACCTAGATTTTATAGCTCAC  
 AATGCCATGATGGATGCCTGCACTGGATCCAATCCTAGAGCAATAACTGAGGAAGAAATGAAAAAGCTCTTGCA  
 GTATATGTATAATGGGCAAAGGTTAATTTCTAG

Seq. ID 78: sequência de aminoácidos de desidrogenase de butanol de *C. ljungdahlii*:

MGRFTLPRDIYFGENALENLKLDGNKAVVVVGGGSMKRFGLAKVEKYLKETGMEVKLIEGVEPDPSVDTVMNGA  
KIMRDFNPDWIVSIGGGSPIDAAMWIFYEYDFTFEKAVVPPGIPKLRQKAQFVAIPSTSGTATEVTSFVITDYKAKI  
KYPLADFNLPDIAIIDPSLAETMPKTLAHTGMDALTHAIEAYVASLHSDFSPLAMHAITMIHKYLLKSYEEDKEARG  
HMHIAQCLAGMAFSNALLGITHSIAHKTGAVFHIPHGCAAIYLPYVIDFNKKACSERYAKIAKKLHLSGNSDELIDSLT  
EMIRTMNKKMDIPLTIKDYGISENDFNENLDFIAHNAMMDACTGSNPRAITEEEMKKLLQYMYNGQKVN\*F\*

Seq. ID 79: sequência de nucleotídeos de desidrogenase de butanol de *C. ljungdahlii*

ATGGAGAGATTTACGTTGCCAAGAGACATTTACTTTGGAGAAGATGCTTTGGGTGCTTTGAAAACGTTAAAAGGT  
AAGAAAGCTGTAGTAGTTGTTGGAGGAGGATCCATGAAGAGATTCGGTTTCCTTGACAAGGTAGAAGAATACTT  
AAAAGAAGCAAACATAGAAGTTAACTAATAAGAAGGTGTTGAACAGATCCGTCTGTGGAAACGTTATGAAAG  
GTGCCAAAATAATGACAGAATTTGGGCCAGATTGGATAGTTGCTATTGGAGGAGGTTACCAATAGATGCTGCA  
AAGGCTATGTGGCTATTTTATGAATATCCAGATTTTACTTTTAAACAAGCAATTGTTCCGTTTGGATTACCAGAATT  
AAGACAAAAAGCTAAAATTTAGCTATAGCTTCTACTAGTGGAACAGCTACTGAAGTTACTTCATTTTCAGTAATA  
ACTGATTATAAAGCTAAAATAAAGTATCCTTTAGCTGACTTCAATTTGACACCGGATATAGCTATAGTTGATCCAG  
CATTAGCCCAGACAATGCCACCTAAATTAAGTGCACATACTGGTATGGATGCATTAAGTGCATGACTAGAAGCTTA  
TGATAGCATCAGCTAGATCAGATATTTTCCAGATCCACTTGCAATACATCCATAATTATGACAAGGGATAACTTACTT  
AAATCCTATAAAGGGTGATAAAGATGCTAGAAAATAAGATGCATATATCACAATGTTTAGCAGGTATGGCATTCTTCT  
AATGCACTTCTTGGTATAACTCATAGTTTAGCACATAAAACAGGAGCTGTATGGCACATACCACATGGATGCGCT  
AATGCAATATATCTCCATATGTTTTAGATTTTAAATAAAAAGCTTGTCTCAGATAGATATGCTAATATAGCTAAAAT  
ATTAGGACTTAAAGGAACTACTGAAGATGAATTGGTAGATTCTCTAGTTAAAATGGTACAAGATATGGATAAGG  
AATTGAATATACCTTTGACCTTAAAAGATTATGGTATAAGCAAAGATGATTTCAATTCAAATGTTGATTTTATAGC  
AAAGAATGCGCTCTTAGATGCATGTACAGGAGCTAATCCAAGGCCTATAGATTTTATGATCAAATGAAAAAGATACT  
TCAATGTATATATGATGGAAAAAAGGTAACCTTTTAA

Seq. ID 80: sequência de aminoácidos de desidrogenase de butanol de *C. ljungdahlii*:

MERFTLPRDIYFGEDALGALKTLKGGKAVVVVGGGSMKRFGLDKVEEYLKEANIEVKLIEGVEPDPSVETVMKGAKIM  
TEFGPDWIVAIGGGSPIDAAMWLFYEYDFTFKQAIVPFGLPELRQKAKFVAIASTSGTATEVTSFVITDYKAKIKYP  
LADFNLPDIAIVDPALAQTMPPKTLAHTGMDALTHALEAYVASARSDISDPLAIIHSIIMTRDNLKSYKGDKDARNKM  
HISQCLAGMAFSNALLGITHSLAHTGAVWHIPHGCAAIYLPYVLDFNKKACSDRYANIAKILGLKGTTEDELVDLSLVK  
MVQDMDKELNIPLTLKDYGISKDDFNSNVDFIAKNALLDACTGANPRPIDFDQMKKILQCIYDGKVKTF\*

FIG. 43

Seq. ID 81: sequência de nucleotídeos de desidrogenase de butanol de *C. ljungdahlii*

ATGGAAAACCTTTATTTTAAAAATGCTACAGAAATTATTTTTGGTAAGGATACCGAAAATCTTGTAGGAAGTAAAGTAAAGGAGTATCAAAGTCAGATAAAATACTCTTTGCTATGGGGGAGGAAGCATAAAAAGATCTGGTCTATATGATAGAGTTATAAAGTCCTTAAAAGAAAATGGAATTGAATTTATAGAATCCAGGAATTAACCTAATCCAAGATTAGGACCTGTTAAAGAAGGTATAAGACTATGTAGAGAAAATAATATAAAATTTGACTATCTGTAGGAGGAGGAAGTTCAGCAGATACGGCTAAAGCTATTGCTGTAGGAGTACCTTATAAAGGAGACGTATGGGATTTTTATACGGCAAAGCTGAAGTGAAAGAGGCTCTCCTGTAGGAGTTGAATAACATTACCTGCTACAGGTACAGAATCTAGTAAAGTCTGTTATTATGAATGAAGATGGTTGGTTTAAAAAAGGATTAATAACAGTACTTATAAGACCTGCTTTTTCAATTATGAATCCTGAACCTACTTTTACACTACCAGAGTATCAAACCTGCTGTGGTGCTTGTGACATTATGGCACATATAATGGAAGATATTTACAAATGTGAAACATGTAGATATAACTGATAGGCTTTGCGAAGCTGCACTTAGAAATGTATAAATAATGCCCAATAGTTTTAAAAGATCCCAAAAATGATGCTAGGGCAGAAATTATGTGGACCGGTACTATAGCTCATAATGATGTGCTTAGTGCGGGTAGAATAGGTGATTGGGCTTCTCACAAAATTGAACATGAATTGAGTGGGAAACAGACATTGCCATGGAGCAGGACTTGCAATTGATTTCTGCATGGATGAAATATGTATATAAACAATATCAATAGATTTGTACAATTTGCAGTAAGGGTATGGGATGTAGATTTATCTTATAGTCTGCGAAGATATTGTACTTGAAGGCATAAGGAGAATGACAGCATTTTCAAGAGCATGGGGTTACCTGTAACCTTAAAAGAAGGAAGTATAGGAGAAGATAAAATTGAAGAAATGGCTAATAAGTGCACGGATAATGGAACCTAAAACCTGTAGGACAATTTGTAAAATTAATAAAGATGATATTGTAAAAATATTAATTTAGCTAAATAA

Seq. ID 83: sequência de nucleotídeos de desidrogenase de butanol de *C. ljungdahlii*

MENFIFKNATEIIFGKDTENLVGSKVKEYSKSDKILFCYGGGSIKRSGLYDRVIKSLKENGIEFIELPKIPNPRLGPVKEGIRLCRENNIKFVLSVGGSSADTAKAIAVGVVPYKGDVWDFYTGKAEVKEALPVGVVITLPATGTESSNSSVIMNEDGWFKKGLNTVLIRPAFSIMNPELFTFLPEYQTACGACDIMAHIMERYFTNVKHVDITDRLCEALRNVINNAPIVLKDPKNYDARAEIMWTGTIAHNDVLSAGRIGDWASHKIEHELSETDIAHGALVFPAMKYVYKHDINRFVQFAVRVWVDVLSYSSCEDIVLEGIRRMATAFFKSMGLPVTLKEGSIGEDKIEEMANKCTDNNGTKTVGQFVKLNKDDIVKILNLAK\*

Seq. ID 84: sequência de aminoácidos de desidrogenase de butanol de *C. ljungdahlii*

ATGGAAGACAAGTTTGAAAATTTAATTTGAAATCCAAGATTTATTTAATAGGGAATCTATTCAACTTTTAGAGCAAGTCACTGGTTCTCGAGCATTTATTGTTGCAGATGCTATTATGGGAAAACCTGGATATCTTCAAAAAGTAAATAGATTACCTAAGCAAAGCTGGAATAAGTCCGTTGTTTTACGGGGGTACACCCTGATCCAGACGTCAATGTAATTGATGCAATGAAATTGTACAAAAAAGCGACGCAGATGTTCTCGTAGCACTAGGTGGAGGATCCAGTATTGATACCGCTAAGGGAATAATGATTTTGCATGTAATTTAGGAAAAGCAATGGGCCAAGAAATGAAAAAACCTCTATTTATGCAATTCATCAACAAGTGGTACAGGCTCTGAAGTAACAACTTTACTGTTATTACTTCTCAGAAAAGAAAAGGTATGCAATATAGATGATTTTATTGCACCAGATGTTGCAACTTACTGACTCAAGTTGATTGATGGTCTGCCTCAGCGTATTGTAGCAGATACTGGTATAGATGTTCTAGTTCATTCTATTGAAGCCTATGTTCCAAAAAAGCAACTGACTTTACAGACGCTCTGCTGAAAAGCAGTTAAATTAATTTTGGAGAATCTTCAAAAATTTATAACGATAGTAAGGATCCGAAGCTCGAGATCATGTTCAAAACGCTTCTGTATAGCAGGAATAGCATTACAAATGCTGGTCTTGAATTAATCACAGCTTGGCTCATGCTATGGGTGGATCTTCCACATTCCTCACGGCCGATCCAATGCACTTCTACTTAATGCAGTAATGGAATACAACGCTAGCTTGGTTGGAAATGCAAGCGAATGCTATGGAAAATACGCAAACTAGCATCAATTCTACACCTCCAGCTCGAACAACCTCGGAAGGCGCTGTAAGTTTTATTGAAGCTGTAGATAAATTAATAAATCCCTAGGTGTTGAAGATAATATTCGATCTCTGGGATTAAGAAGATGAGTTTCAAAGTGCTCTAAATCATATGGCAGAAACAGCAATGCAAGATAGATGCACTCCAACCTAATCCTAGAAAACCTTCAAAGAAGAACTTATACATATTTATCAAAAATGTTATTA

FIG. 44

Seq. ID 84: sequência de aminoácidos de desidrogenase de butanol de *C. ljungdahlii*  
 MEDKFENFLKSKIYFNRESIQLEQVTSRAFIVADAIMGKLGYLQKVIDYLSKAGISSVVFTGVHPDPDVNVIADAMK  
 LYKKSADADVLVALGGSSIDTAKGIMYFACNLGKAMGQEMKKPLFIAIPSTSGTGSEVTNFTVITSQKEKVCIIIDFIAPD  
 VAILDSSCIDGLPQRIVADTGIDVLVHSIEAVVSKKATDFTDALAEKAVKLIFENLPKIYNDKSEARDHVQNASCIAGIA  
 FTNAGLGINHSLAHAMGGSFHIPGRSNALLNNAVMEYNASLVGNASEHAMEKYAKLASILHLPARTTREGAVSFIEA  
 VDKLIKSLGVEDNIRSLGIKEDEFQSALNHMAETAMQDRCTPTNPRKPSKEELIHYYQCY\*

Seq. ID 85: sequência de nucleotídeos de butiril/acetil transferase de fosfato de *C. ljungdahlii*  
 ATGAAATTGATGGAAAAATTTGGAGTAAGGCAAAGGAAGACAAAAAAGATTGTCTTAGCTGAAGGAGAAG  
 AAGAAAGAACTCTCAAGCTTGTGAAAAATAATTAAGAGGGTATTGCAAATTTAATCCTTGTAGGGGAATGAAA  
 AGGTAATAAAAAGAAAAGCGTCAAAATTAGGTGTAAGTTTAAATGGAGCAGAAATAGTAGATCCAGAGACTTCA  
 GATAAACTAAAGGCATATGCAGATGCTTTTATGAATTGAGAAAGAAGAAGGGAATAACGCCAGAAAAAGCGG  
 ATAAAATAGTAAGAGATCCAATATACTTTGCTACAATGATGGTTAAACTTGGAGATGCAGATGGATTGGTTTCAG  
 GTGCGGTTCACTACTACAGGTGATCTTTGAGACCAGGACTTCAAATAGTAAAGACAGCTCCAGGTACATCAGTAG  
 TTTCCAGTACATTTATAATGGAAGTACCAATTTGTGAGTATGGTGACAATGGTGACTTCTATTGCTGATTGTGC  
 TGTAATCCATGCCAGATAGTGATCAATGGCTTCAATTGCAATAAGTACAGCAGAAACTGCAAAGAACTTATG  
 TGGAAATGGATCCAAAAGTAGCAATGCTTTCACTTTCTACTAAGGGAAGTGCAAAACACGAATTAGTAGACAAAGT  
 TAGAAATGCTGTAGAGATTGCAAAAAAGCTAAACCAGATTTAAGTTTGTAGACGGAGAATTACAATTAGATGCCTC  
 TATCGTAGAAAAAGTTGCAAGTTTAAAGGCTCTGGAAGTGAAGTAGCAGGAAAAGCAAATGTACTTGTATTTC  
 AGATCTCCAAGCAGGAAATATAGGCTATAAACTCGTTCAAAGATTGCAAAAGCAGATGCTATAGGACCTGTATG  
 CCAAGGATTTGCAAAACCTATAAATGATTTGTCAAGAGGATGTAATCTGATGATATAGTAAATGTAGTAGCTG  
 AACAGCAGTTCAAGCACAAGCTCAAAAGTAA

Seq. ID 86: sequência de aminoácidos de butiril/acetil transferase de fosfato de *C. ljungdahlii*  
 MKLMEKIWSKAKEDKKKIVLAEGEERTLQACEKIIKEGIANLILVGNKVIKASKLGVSLNGAEIVDPETSDKLKAYA  
 DAFYELRKKKGITPEKADKIVRDPYFATMMVKLGDADGLVSGAVHTTGDLRPLQIVKTAPGTSVVSSTFIMEVPC  
 EYDNGVLLFADCAVNP CPDSDQLASIAIETAETAKNLGMDPKVAMLSFSTKGSAKHELVDKVRNAVEIAKKAKPDL  
 SLDGELQLDASIVEKVASLKAPGSEVAGKANVLFVFDLQAGNIGYKLVQRFKADAIGPVCQGFAPKINDLSRGCNSD  
 DIVNVVAVTAVQAQAQK\*

Seq. ID 87: sequência de nucleotídeos de quinase de acetato/butirato de *C. ljungdahlii*  
 ATGAAAATATTAGTAGTAACTGTGGAAGTTTCATCTTTAAAATATCAACTTATTGATATGCAAGATGAAAGTGTTG  
 TAGCAAAGGGTCTGTAGAAAGAATAGGAATGGACGGTTCAATTTAACACAGAAAGTTAATGGAGAAAAGTTT  
 GTTACAGAGCAAACAATGGAAGACCACAAAGTTGCTATACAATTAGTATTAATGCTCTTGTAGATAAAAAACAT  
 GGTGTAATAAAAGACATGTCAGAAATATCCGCTGTAGGACATAGAGTCTTGCACGGTGGAAAGAAATATGCAGC  
 ATCCATCTTATTGACGAAAATGTAATGAAAGCAATAGAAGAATGTATCCCACTAGGACCACTACATAATCCAGCT  
 AATATAATGGGAATAGATGCTTGTAAAAATTAATGCCAAACTCTCAATGGTAGCAGTATTTGATACAGCATTTT  
 ATCAGACAATGCCAGATTATGCTTATACTTATGCAATACCTTATGATATATCTGAAAAGTATGATATCAGAAAATA  
 TGGTTTTCATGGAACCTTCTCATAGATTCGTTTCAATTGAAGCAGCTAAATTATTAAGAAAAGATCCAAAAGATCTT  
 AAGTTAATAACTTGTCAATTTAGGAAATGGAGCTAGCATATGTGCAGTAAACCAAGGAAAAGCAGTAGATACAAC  
 GATGGGACTTACTCCTTGTGAGGACTTGAATGGGAAGTATGCGGTGATATAGATCCAGCTATAGTACCATT  
 TGTAATGAAAAGAACAGGCATGCTGTAGATGAAGTGGATACCTTAATGAATAAAAAGTCAAGGAATACTTGGAG  
 TATCAGGAGTAAGCAGTGATTTTAGAGATGTAGAAGAAGCTGCAAATTCAGGAAATGATAGAGCAAACCTTGCA  
 TTAATATGATTATCACAAGTTAAATCTTTCATAGGAGCTTATGTTGCAGTTTTAAATGGAGCAGATGCTATAA  
 TATTTACAGCAGGACTTGGAGAAAATTCAGCAACTAGCAGATCTGCTATATGTAATGGATTAAGCTATTTGGAA  
 TTAATATAGATGAAGAAAAGAATAAGAAAAGGGGAGAGGCACTAGAAATAAGCACACCTGATTCAAAGATAAA  
 AGTATTAGTAATTCCTACAAATGAAGAACTTATGATAGCTAGGGATACAAAAGAAATAGTTGAAAATAAATAA

FIG. 45

Seq. ID 88: sequência de aminoácidos de quinase de acetato/butirato de *C. ljungdahlii*

MKILVVNCGSSSLKYQLIDMQDESVVAKGLVERIGMDGSILTHKVNGEKVFTEQTMEDHKVAIQLVLNALVDKKHGV  
 KDMSEISAVGHRV LHGGKYYAASILIDENVMKAIIECIPLGLHNPANIMGIDACKKLPNTPMVAVFDTAHQTMP  
 DYAYTYAIPYDISEKYDIRKYGFHGTSHRFVSEIAAKLLKKDPKDLKLITCHLNGASICAVNQKAVDTTMGLTLAGLV  
 MGTRCGDIDPAIVPFV MKRTGMSVDEVDTLMNKKSGILGVSGVSSDFRDVEEAANSNDRAKLALNMYHHKVKFSI  
 GAYVAVLNGADAIIFTAGLGENSATSRSIAICNGLSYFGIKIDEENKRRGEALEISTPDSKIKVLVIPTNEELMIARDTKEIV  
 ENK\*

Seq. ID 89: sequência de nucleotídeos de óxido-redutase de aldeído:ferredoxina de *C. ljungdahlii*

ATGTACGGATATAAGGGTAAGGTATTAAGAATTAATCTAAGTAGTAAAACTTATATAGTGAAGAATTGAAAATT  
 GACAAAGCTAAAAATTTATAGGTGCAAGAGGGTTAGGCGTAAAAACCTTATTTGACGAAGTAGATCCAAAGGT  
 AGATCCATTATCACCTGATAACAAATTTATTATAGCAGCGGGACCCTTACAGGTGCACCTGTTCCAACAAGCGG  
 AAGATTCATGGTAGTTACTAAATCACCTTTAACAGGAACATTGCTATTGCAAATTCAGGTGGAAAATGGGGAGC  
 AGAATTCAAAGCAGCTGGATACGATATGATAATCGTTGAAGGTAATCTGATAAAGAAGTTTATGTAAATATAGT  
 AGATGATAAAGTAGAATTTAGGGATGCTTCTCATGTTGGGGAAAACTAACAGAAGAACTACAAAAATGCTTCA  
 ACAGGAAACAGATTCGAGAGCTAAGGTTTTATGCATAGGACCAGCTGGGGAAAAGTTATCACTTATGGCAGCAG  
 TTATGAATGATGTTGATAGAACAGCAGGACGTTGGTGGTGGAGCTGTTATGGGTTCAAAGAACTTAAAAGCT  
 ATTGTAGTTAAAGGAAGCGGAAAAGTAAAATTTTATGATGAACAAAAAGTGAAGGAAGTAGCACTTGAGAAAAC  
 AAATATTTTAAAGAAAAGATCCAGTAGCTGGTGGAGGACTTCCAACATACGGAACAGCTGTACTTGTTAATATTAT  
 AAATGAAAATGGTGTACATCCAGTAAAGAATTTTCAAATCTTATACAGATCAAGCAGATAAGATCAGTGGAGA  
 AACTTTAACTAAAAGATTGCTTAGTTAGAAAAATCCTTGCTATAGGTGTCCAATTGCCTGTGGAAGATGGGTA  
 ACTTGATGATGGAACGAATGTGGAGGACCAGAATATGAAACATTATGGTCATTTGGATCTGATTGTGATGTATA  
 CGATATAAATGCTGTAAATACAGCAAATATGTTGTGAATGAATATGGATTAGATACCATTACAGCAGGATGTAC  
 TATTGCAGCAGCTATGGAACCTTATCAAAGAGGTTATATTAAGGATGAAGAAATAGCAGCAGATGGATTGCTACT  
 TAATTGGGGAGATGCTAAGTCCATGGTTGAATGGGTAAAGAAAATGGGACTTAGAGAAGGATTTGGAGACAAG  
 ATGGCAGATGGTTCATACAGACTTTGTGACTCATACGGTGTACCTGAGTATTCAATGACTGTAAAAAACAGGAA  
 CTTCCAGCATATGACCCAAGAGGAATACAGGGACATGGTATTACTTATGCTGTTAAACAATAGGGGAGGATGTCAC  
 ATTAAGGGATATATGGTAAAGTCTGAAACTTGGCTATCCAGAAAACTTGATAGACTTGCAGTGGAAAGGAAA  
 AGCAGGATATGCTAGAGTATTCCATGATTTAACAGCTGTTATAGATTCACTTGGATTATGATTTTTACAACATTTG  
 GTCTTGGTGCACAGGATTATGTTGATATGTATAATGCAGTAGTTGGTGGAGAATTACATGATGTAAATCTTTAAT  
 GTTAGCTGGAGATAGAATATGGACTTTAGAAAAATATTTAACTTAAAGGCAGGCATAGATAGTTTACAGGATAC  
 TCTTCAAAGAGATTGCTTGAAGAACAATTCAGAAGGACCATCAAAGGAGAAGTTCATAAGTTAGATGTACT  
 ACTACCTGAATATTATTCAGTACGTGGATGGGATAAAAATGGTATTCTACAGAGGAAACGTTAAAGAAATTAGG  
 ATTAGATGAATACGTAGGTAAGCTTTAG

Seq. ID 90: sequência de aminoácidos de óxido-redutase de aldeído:ferredoxina de *C. ljungdahlii*

MYGYKGVLRINLSSKTYIVEELKIDKAKKFIGARGLGVKTLFDEVDPKVDPLSPDNKFIIAAGPLTGAPVPTSGRFMVVT  
 KSPLTGTIAIANS GGKWGAEFKAAGYDMIIVEGKSDKEVYVNIIVDDKVEFRDASHVWGKLTTEETKMLQQETDSRAK  
 VLCIGPAGEKLSLMAAVMNDVDRTAGRGGVGAVMGSKNLKAIIVKSGSKVCLFDEQKVKEVALEKTNILRKDPVAG  
 GGLPTYGTAVLVNIINENGVHPVKNFQKSYTDQADKISGETLTKDCLVRKNPCYRPIACGRWVKLDDGTECGGPEYE  
 TLWSFGSDCDVYDINAVNTANMLCNEYGLDITAGCTIAAMELYQRGYIKDEEIAADGLSLNWGDAKSMVEVWVK  
 MGLREGFGDKMADGSYRLCDSYGVPEYSMTVKKQELPAYDPRGIQGHGITYAVNNRGGCHIKGYMVSPEILGYPEKL  
 DRLAVEGKAGYARVFDLTAVIDSLGLCIFTTFGLGAQDYVDMYNAVVGELHDVNSLMLAGDRIWTLEKIFNLKAGI  
 DSSQDTPKRLLEEIQIPEGPSKGEVHKLDVLLPEYYSVRGWDKNGIPTTEETLKKLGLDEYVGL\*



Seq. ID 91: sequência de nucleotídeos de óxido-redutase de aldeído:ferredoxina de *C. ljungdahlii*

ATGTATGGTTATGATGGTAAAGTATTAAGAATTAATTTAAAAGAAAGAACTTGCAAATCAGAAAATTTAGATTTA  
GATAAAGCTAAAAAGTTTATAGGTTGTAGGGACTAGGTGTTAAAACCTTATTTGATGAAATAGATCCTAAAATA  
GATGCATTATCACCAGAAAATAAATTTATAATTGTAACAGGTCCTTAACTGGAGCTCCGGTCCAACTAGTGAA  
GGTTTATGGTAGTACTAAAGCACCGCTTACAGGAACTATAGGAATTTCAAATTCGGGTGGAAAATGGGGAGTA  
GACTTAAAAAAGCTGGTTGGGATATGATAATAGTAGAGGATAAGGCTGATTCACCAGTTTACATTGAAATAGTA  
GATGATAAGGTAGAAAATAAAGACGCGTCACAGCTTTGGGGAAAAGTTACATCAGAACTACAAAAGAGTTAGA  
AAAGATAACTGAGAATAAATCAAAGGTATTATGTATAGGACCTGCTGGTGAACGATTGTCTCTTATGGCAGCAGT  
TATGAATGATGTAGATAGAAGTGCAGCAAGAGGCGGCGTGGTGCAGTTATGGGATCTAAAACTTAAAAGCTA  
TTACAGTTAAAGGAACTGGAAAAATAGCTTTAGCTGATAAAGAAAAGTAAAAAAGTGTCCGTAGAAAAAATT  
ACAACATTAAAAAATGATCCAGTAGCTGGTCAGGGAATGCCAATTATGGTACAGCTATACTGGTTAATATAATA  
AATGAAAATGGAGTTCATCCTGTAAAGAATTTCAAGAGTCTTATACGAATCAAGCAGATAAAAATAAGTGGAGAG  
ACTCTTACTGCTAACCAACTAGTAAGGAAAAATCCTTGTACAGCTGTCCTATAGGTTGTGGAAGATGGGTTAGA  
CTAAAAGATGGCACAGAGTGCAGGAGGACCAGAAATGAAACTGTGGTGTGTTGGATCTGACTGTGGTTCATA  
TGATTTAGATGCTATAAATGAAGCTAATATGTTATGTAATGAATATGGTATTGATACTATTACTTGTGGTGAACA  
ATTGCTGCAGCTATGGAACCTTATCAAAGAGGATATATAAAGACGAAGAAATAGCTGGAGATAACCTATCTCTC  
AAGTGGGGTGATACGGAATCTATGATTGGCTGGATAAAGAGAATGGTATATAGTGAAGGCTTTGGAGCAAAGA  
TGACAAATGGTTCATATAGGCTTTGTGAAGTTATGGAGCACCGGAGTATTCTATGACAGTAAAAAGCAGGAA  
ATCCAGCATATGATCCAAGGGGAATACAGGGACACGGTATTACCTATGCAGTAAATAAGAGGAGGCTGTCA  
TATTAAGGGATATATGATTAACCCTGAAATATTAGGTTATCCTGAAAACTTGATAGATTTGCATTAGATGGTAAA  
GCAGCTTATGCCAAATTTTCATGATTTAACTGCTGTAATTGATTCTTTAGGATTGTGCATATTCACACTATTGG  
GCTTGAATACAGGATTATGTAGATATGTATAATGCAGTAGTAGGAGAATCTACTTATGATGCAGATTCACTATT  
AGAGGCAGGAGATAGAATCTGGACTCTTGAGAAATTATTTAATCTTGAGCTGGAATAGACAGCAGCCAGGATA  
CTCTACCAAAGAGATTGTTAGAAGAACCTATTCCAGATGGCCATCAAAGGGAGAAGTTCATAGGCTAGATGTTT  
TTCTGCCAGAATATTACTCAGTACGAGGATGGAGTAAAGAGGGTATACCTACAGAAGAAACATTAAGAAATTA  
GGATTAGATGAATATATAGGTAAGTTCTAG

Seq. ID 92: sequência de aminoácidos de óxido-redutase de aldeído:ferredoxina de *C. ljungdahlii*

MYGYDGKVLRLNKERTCKSENLDLKDAKKFIGCRGLGVKTLFDEIDPKIDALSPENKFIIVTGPLTGAPVPTSGRFMVVT  
KAPLTGTIGISNSGGKVGVDLKKAGWDMIIIVEDKADSPVYIEIVDDKVEIKDASQLWGVKVTSETTKELEKITENKSKVLC  
IGPAGERLSLMAAVMNDVDRTAARGGVGAVMGSKNLKAITVKGTGKIALADKEKVKVSVVEKITTLKNDPVAGQGM  
PTYGTAILVNIINENGVHPVKNFQESYTNQADKISGETLTANQLVRKNPCYSCPIGCRWVRLKDGTECGGPEYETLW  
CFGSDCGSYDLDAINEANMLCNEYGIDTITCGATIAAAMELYQRYIKDEEIIAGDNLKLVGDTESMIGWIKRMVYSE  
GFGAKMTNGSYRLCEGYGAPEYSMTVKKQEI PAYDPRGIQGHGITYAVNNRGGCHIKGYMINPEILGYPEKLDRLFALD  
GKAAYAKLFHDLTAVIDSLGLCIFTTFGLGIQDYVDMYNAVVGESTYDADSLLEAGDRIWTLKLFNLAAAGIDSSQDTLP  
KRLLLEPIPDGPSKGEVHRLDVLPEYYSVRGWSKEGIPTEETLKKLGLDEYIGKF\*

FIG. 47

Seq. ID 93: sequência de nucleotídeos de deidrogenase de butanol/butiraldeído bifuncional de *C. ragsdalei*

ATGCCAAGAAATCTGTTTATATTTAACAGCATGAAAAATAAGAAAGAGGTGTCATTAATGAAGGTAACCTAAGGTAACCTAACG  
 TTGAAGAATTAATGAAAAAGTTAGATGAAGTAACGGCTGCTCAAAAAAATTCTCTAGTTATAGTCAGGAACAAGTGGATGA  
 GATCTTTAGGCAGGCAGCTATGGCAGCCAATAGTGTAGAAATAGATCTAGCTAAAATGGCAGTGGAAAGAAAGCGGAATGGG  
 AATTGTAGAAGACAAGTTATTAATAATCATTTTGTTCAGAAATATATATAACAAATATAAGGATGAAAAGACCTGTGGAG  
 TTTTAGAAGAAGACCAAGGTTTTGGTATGGTTAGAAATGCGGAACCTGTAGGGTTATAGCAGCAGTAGTTCCAACAATA  
 TCCAACATCCACAGCAATCTTTAAATCTTTAATAGCTTTGAAAAGTAAATGGTATAGTTTTTACCACATCCAAGAGCAAA  
 AAAATCAACTATTGCAGCAGCTAAGATAGTACTTGTATGAGCAGTAAAGCTGGTGTCTCTGAAGGAATTATAGGATGGATA  
 GATGAACCTTCCATTGAACTCTCACAGGTGGTAATGAAAGAAGCAGATTAATCTTGAACCTGGTGGCCCGGTATGGTTAA  
 GGCTGCCTATCTCAGGAAAGCCTGCTATAGGAGTTGGCCAGGTAACACACCTGCTGTAATTGATGAAAGTCTGATATTA  
 AAATGGCAGTAAATCAATACTCTTTCAAAAACCTTTGATAATGGTATGATTTGTGCTTCAGAGCAGTCAAGTAGTTGTA  
 GCTCAATATACGATGAAGTCAAGAAAGAAATTTGCAGATAGAGGAGCGTATATTAAGTAAGGATGAAACAGATAAGGTTG  
 GAAAAACAATTATGATTAATGGCGCTCAATGCTGGCATTGTAGGGCAAAGTCTTTAAAAATAGCACAGATGGCAGGAGT  
 GAGTGTACCAGAGGATGCTAAAGTACTTATAGGAGAAGTAAATCAGTAGAACCTGAAGAAGAGCCCTTTGCTCATGAAAA  
 CTGTCTCCAGTTTTAGCTATGTACAAAGCAAAAGATTTTGTGAAGCACTTCTAAAGGCTGGAAAGATTAGTTGAACGAGGTG  
 GAATTGGGCATACATCTGTATTATGTAATCAATGACGGAAAAAGTAAAGTAGAAAAAGTTCAGAGAAACTATGAAGAC  
 TGGTAGAACATTGATAAATGCTTCAGCACAAGGTGCTATAGGAGATATATAACTTTAAACTAGCTCCTCTTTGACGCT  
 AGGATGTGGTTCTGGGGAGGAACTCTGTATCAGAAAAATGTTGGACCTAAACATTTATTAACATAAAAAAGTGTGCTGAG  
 AGGAGAGAAAAATGCTTTGGTTAGAGTACCTGAAAAAGTTATTTCAAATATGGTAGTCTTGGAGTTGCATTAAGGAATT  
 GAGAAGTTGGAGAAAGAAAGGCATTTATAGTAACGGATAAGGTTCTTTATCAATTAGGTTATGTAGATAAAATACAAAA  
 AATCTCGATGAATTAAGAGTTTCATATAAAATATTTACAGATGTAGAACCAGATCCAACCTTGTACAGCTAAAAAGGTGC  
 ATCAGAAGTCTTCTATGAACAGATACAATTATAGCAGTTGGTGGTGGTTCGGCAATGGATGCAGCCAAGATCATGTGG  
 GTAATGTATGAGCATCCAGAAGTAAGATTTGAAGATTTGGCTATGAGATTTATGGATATAAGAAAGAGAGTATATGTTTTCC  
 TAAGATGGGTGAAAAAGCAATGATGATTTCAAGTAGCAACATCCGAGGAACAGGATCTGAAGTTACTCCATTTGCAGTAATT  
 ACGGATGAAAGAACAGGAGCTAAATATCCACTGGCTGATTATGAATTGACTCAAACATGGCTATAATTGATGCAGAAGTAT  
 GATGGGAATGCCAAAAGGGCTTACAGCAGCTTCGGGTATAGATGCAATTAACCATGCACTGGAGGCGTATGTATCAATAATG  
 GCTTCAGAAATATACCAATGGATTGGCTCTTGAAGCAACAAGATTAGTATTTAAATAATTTGCCAATAGCTTATACAGAAGGTAC  
 AACTAATGTAAGGCAAGAGAAAAAATGGCTCATGCTCAACTATAGCAGGTATGGCTTTTCCCAATGCATTCTAGGGGTAT  
 GTCCTCTATGGCACATAAATTTGGGAGCACAGCACCATATACCACATGGAATTGCAATGCGCTTATGATAGATGAAGTTATA  
 AAATCAATGCTGTAGAGGCTCCAAGGAAACAAGCGGCATTTCCACAATATAAGTACCAAAATGTTAAAAAGAAGATGCTA  
 GAATAGCTGATTACTTAAATTTAGGAGGAAGCACAGATGAAAAAGTACAATTGCTAATAAATGCTATAGATGACTTAAA  
 AACTAAGTTAAATATCCAAAGACTATTAAGAGGCAAGGAGTTTCAAGAAGATAAATTTCTATGCTACTTTAGACACAATGTCAG  
 AACTGGCTTTGATGATCAATGTACAGGAGCTAATCCAAGATATCCACTAATAGGAGAAATAAAACAAATGTATATAAATGCA  
 TTTGATACCAAAAGGCAACTGTGGAGAAGAAAAACAAAAAGAAAAATAAACATATAA

FIG. 48

Seq. ID 94: sequência de aminoácidos de deidrogenase de butanol/butiraldeído bifuncional de *C. ragsdalei*

MPRNLFI FNSMKNKKEVSLMKVTKVTNVEELMKKLEVTAAQKKFSSYSQEQVDEIFRQAAMAANSARIDLAKMAVEESGMGIV  
 EDKVIKNHFVSEYIYNKYKDEKTCGVLEEDQGGFMVRIAEPVGVIAAVVPTTNPSTAIKSLIALKTRNGIVFSPHPRAKKSTIAAAKI  
 VLDAAVKAGAPEGIIGWIDEPSIELSQVVMKEADLILATGGPGMVKAAVSSGKPAIGVGPNGNTPAVIDESADIKMAVNSILLSKTFD  
 NGMICASEQSVVVSSYIYDEVKKEFADRGAYILSKDETDKVGKTIMINGALNAGIVQSAFKIAQMAGVSVPEADAKVLIGEIVKSVEP  
 EEFPFAHEKLSPLAMYKAKDFDEALLKAGRLVERGGIGHTSVLYVNSMTEKVKVEKFKRETMTGRTLINMPSAQGAIGDIYNFKLA  
 PSLTLGCGSWGNSVSENVGPKHLLNIKVAERRENMLWFRVPEKVFYKYSGLVALKELRTLEKKKAFIVTDKVLVQLGYVDKIK  
 NLDELRSYKIFDVEPDPTLATAKKGASELLSYEPDTIIAVGGGSAMDAAKIMWVMYEHPEVRFEDLAMRFMDIRKRVYVFPKM  
 GEKAMMISVATSAGTGEVTPFAVITDERTGAKYPLADYELTPNMAIIDAEELMMGMPKGLTAASGIDALHLEAYVSIMASEYTN  
 GLALEATRLVFKYLPYIAYTEGTTNVKAREKMAHASTIAGMAFANAFGLVCHSMHKLGAQHHPHIGIANALMIDEVIKFNAVEAPR  
 KOAFAFPQYKYPNVKRRYARIADYLNILGGSTDEKVVQLLINAIDDLKTKLNIPKTIKEAGVSEDKFYATLDTMSELAFFDQCTGANPR  
 YPLIGEIKQMYINAFDTPKATVEKTKRKINI\*

FIG. 49

Seq. ID 95: sequência de nucleotídeos de desidrogenase de butanol/butiraldeído bifuncional de *C. ragsdalei*

ATGAAAGTTACAAACGTGGAAGAATTAATGAAAAGACTAGAAGAGATAAAGGATGCTCAAAGAAATTTGCTAC  
 ATATACTCAAGAACAGTGGATGAAATTTTTAGACAAGCAGCTATGGCAGCCAATAGTGCTAGAATAGAACTAGC  
 TAAAATGGCAGTGGAAAGAAAGCGGAATGGGAATTGTAGAAGACAAGGTTATTAATACTTTGCTCAGAAT  
 ATATATATAACAAATATAAGGATGAAAAGACCTGTGGAGTTTTAGAAAAGAGATGCAGGCTTTGGTATAGTTAGA  
 ATTGCGGAACCTGTAGGGGTTATTGCAGCAGTAGTTCCAACAATAATCCAACATCTACAGCAATCTTTAAATCAC  
 TAATAGCTTTAAAACTAGAAATGGTATAATTTTTACCAGCATCCAAGGGCAAAGAAATCAACTATTGCAGCAGC  
 TAAAATAGTACTTTGATGCTGCAGTTAAAGCTGGTCTCCCGAAGGAATTATAGGATGGATAGATGAACCTTCCAT  
 TGAACCTTCACAGGTGGAATGGGAGAAGCAAATTTAATTTCTGCAACTGGTGGCCCGGGTATGGTTAAGGCTGC  
 CTATTCTCAGGAAAACCTGCTGTAGGAGTTGGCCAGGTAATACACCTGCTATAATTGATGAAAGTGCCGATAT  
 TAAAATGGCAGTAAATCAATTAATCTCTCAAAAACCTTTGATAATGGTATGATTTGTGCTCAGAGCAGTCAGTA  
 ATAGTTTTAGACTCAATATATGAGGAAGTTAAAAAGAATTTGCTTATAGGGGAGCTTATATATTGAGTGAGGAT  
 GAAACAGATAAGGTTGGAAAAATAATTTAAAAAATGGAGCCTAAATGCTGGTATTGTAGGACAAAAGTGCTTTT  
 AAAATAGCACAGCTGGCAGGAGTGAACGTACCAGAAAAGCTAAAGTACTTATAGGAGAGGTAGAATCAGTAG  
 AACTTGAAGAACCATTTTCTCATGAAAAGTTATCTCCAGTTTTAGCTATGTACAGGGCAAAGAGATTTTGAGGATGC  
 CATTGCAAAAACCTGATAAACTGGTTAGGGCAGGTGGATTTGGACATACATCTTCATTATATGTAATCCAATGAC  
 AGAAAAAGCAAAGTAGAAAAATTTAGTACTATGATGAAAACATCAAGAACTATAATTAACACACCTTCATCTCA  
 AGGTGGTATAGGTGACATATATAACTTTAAGCTAGCTCCTTCGCTGACGCTAGGCTGCGGATCTTGGGGAGGAA  
 ACTCTGTATCCGAAAATGTTGGGCCAAACATTTATTAACATAAAAAGTGTGGCTGAGAGGAGAGAAAAATATGC  
 TTTGGTTTAGAGTGCTGAAAAGGTTTATTTCAAATACGGTAGTCTTGGAGTTGCATTAAGAATTAAGTTAT  
 GAATAAGAAGAAAGTATTTATAGTAACAGATAAAGTCTTTATCAATTAGGTTATGTGGACAAAGTTACAAAAGT  
 TCTTGAGGAACATAAAAATTTCTATAAAGTATTTACAGATGTAGAACCAGATCCAACCTTGCTACAGCTAAAAAA  
 GGTGCAGCAGAATTGCTGCATATGAACCGGATACAATTATATCAGTTGGTGGTGGTTCAGCAATGGATGCAGCC  
 AAGATTATGTGGTAATGTATGAGCATCCAGAAGTAAAAATTTGAAGATTTAGCTATGAGATTTATGGATATAAGA  
 AAGAGAGTATATGTTTTCCCTAAGATGGGAGAAAAAGCAATGATGATTTAGTAGCAACATCCCGCAGGTACAGG  
 ATCAGAAGTTACTCCATTTGCAGTAATTACAGATGAAAAAACAGGAGCTAAATATCCATTAGCTGATTATGAGTT  
 AACTCCAACATGGCTATAGTTGATGCAGAACTTATGATGGGAATGCCAAGAGGACTTACGGCAGCGTCAGGTA  
 TAGATGCATTAACCTCATGCACTGGAAGCTTATGTATCAATAATGGCTACAGAATTTACCAATGGATTAGCCCTTGA  
 AGCAGTAAAGTTGATATTTGAATATTTACCAAAGCTTATACAGAAGGTACAATAATGTAAGGCAAGAGAAAA  
 AATGGCTCATGCTTCATGTTGCTGGTATGGCTTTTGCAAATGCATTCTTAGGGGTATGCCACTCTATGGCACAT  
 AAATTAGGAGCACAGCACCATACCACATGGAATTGCTAATGCATTATGATAGATGAAGTTATAAAAATCAAT  
 GCTGTAGATGATCCAATAAAACAAGCTGCATTTCTCAATACGAGTATCCAATGCCAAGTATAGATATGCTCAG  
 ATAGCTGATTGCTCAACTTAGGAGGAAATACAGAAGATGAAAAGGTGCAATTATAATAAATGCTATAGATGAT  
 CTAAGGCTAAGTTAAATATCCAGAAACGATTAAGAAGCAGGAGTTTCAAGAAGAAAAATCTATACTACTTTA  
 GATAAATGTCAGAATTAGCTTTTGTATGATCAATGTACAGGAGCTAACCCAAGGTATCCACTAATAAGTGAATA  
 AAACAAATGTATATAAATGTTTTGATAAACTGAACCAATTGTAGAAGATGAAGAAAAGTAA

FIG. 50

Seq. ID 96: sequência de aminoácidos de deidrogenase de butanol/butiraldeído bifuncional de *C. ragsdalei*

MKVTNVEELMKRLEEIKDAQKFFATYTTQEQVDEIFRQAAMAANSARIELAKMAVEESGMGIVEDKVIKNHFASEYIYN  
 KYKDEKTCGVLERDAGFGIVRIAEPVGVIAAVVPTTNPSTAIKSLIALKTRNGIIFSPHPRACKSTIAAAKIVLDAAVKAG  
 APEGIIGWIDEPSIELSQVVMGEANLILATGGPGMVKAAYSSGKPAVGVGPGNTPAIIDESADIKMAVNSILLSKTFDN  
 GMICASEQSVIVLDSIYEEVKKEFAYRGAYILSEDETDKVGKIIKNGALNAGIVGQSAFKIAQLAGVNVPEKAKVLIGEVE  
 SVELEEFPSHEKLSPLAMYRARDFEDAIAKTDKLVRRAGGFGHTSSLYVNPMTKAKVEKVFSTMMKTSRTIINTPSSQG  
 GIGDIYNFKLAPSLTLGCGSWGGNSVSENVGPKHLLNIKVAERRENMLWFRVPEKVYFKYGLVALKELVMNKKK  
 VFIVTDKVLVYQLGYVDKVTKVLLEELKISYKVFTDVEPDTLATAKKGAAELLSYEPDTIISVGGGSAMDAAKIMWVWME  
 HPEVKFEDLAMRFMDIRKRVYVFPKMGEKAMMISVATSAGTGSEVTPFAVITDEKTGAKYPLADYELTPNMAIVDAE  
 LMMGMMPRGLTAASGIDALTHALEAYVSIMATEFTNGLALEAVKLIFEYLPKAYTEGTTNVKAREKMAHASCIAGMAFA  
 NAFLGVCHSMHKLGAQHHPHGIANALMIDEVIKFNVDPIKQAAFPQYEYPNAKYRYAQIADCLNLGGNTEDEK  
 VQLLINAIDDLKAKLNIPETIKEAGVSEEKFYTTLDKMSELAFDDQCTGANPRYPLISEIKQMYINVFDKTEPIVEDEEK\*

Seq. ID 97: sequência de nucleotídeos de deidrogenase de butiraldeído de *C. ragsdalei*

ATGGAGGGAACACAATTGGAAAATTTTGATAAAGACTTACGCTCTATACAAGAAGCAAGAGATCTTGCACGTTTA  
 GGAAAAATTGCAGCATGTGAAATTGCTGATTACTGAAGAACAATTGATAAAATCCTATGTAATATGGTTAGG  
 GTAGCAGAGGAAAATGCAGTTTGCCTTGGTAAAATGGCTGCAGAAGAACTGGTTTTGGAAAAGCTGAAGATAA  
 GGCTTATAAGAACCATATGGCTGCTACTACAGTATATAATTATATCAAGGATATGAAGACTATTGGTGTATAAAA  
 GAAGATAAAAGTCAAGGTGTAATTGAAATTTGCTGAACCAGTTGGTTTATTAATGGGTATTGTACCATCTACAAATC  
 CAACATCTACTGTTATCTATAAATCAATCATTGCAATTAATCAAGAAATGCAATTGTATTCTCACACACCCAGCT  
 GCATTAATAATGTTCAACAAAAGCAATAGAACTTATGCGTGATGCAGCAGTAGCAGCAGGAGCTCCTGCAAATGT  
 AATTGGCGGTATTGTTACACCATCTATACAAGCTACAAATGAAGTTATGAAAGCTAAAGAAGTTGCTATGATAATT  
 GCCACTGGAGGCCCTGGAATGGTAAAGGCTGCTTATAGTTACAGGAACACCTGCAATAGGCGTTGGTGTGTTAA  
 CTCTCCATCTTATATAGAAAGAACTGCTGATGTTTCAATCAGTTAAAGATATAATTGCTAGTAAGAGTTTTGAC  
 TATGGTACTATTTGTGCATCTGAGCAATCAATAATTGTTGAAGAAATGCAACCATGATGAAGTAATAGCTGAGTTG  
 AAGAAACAAGGCGGATATTTTATGACAGCTGAAGAAAAGTTGCAAGTATACTTTTTAAGCCTGGTACA  
 CACAGTATGAGTGCTAAGTTTGTAGGAAGAGCTCCTCAGTTATAGCAGCAGCTGCAGGTTTCTCAGTTCCAGAA  
 GGAACAAAAGTTTTAGTAGGAGAACAAGGCGGAGTTGGTAAATGGTTACCCTCTATCTTATGAGAAAAGTTACAACA  
 GTACTTGCTTTCTATACAGTTAAAGATTGGCATGAAGCATGTGATCTTAGTATAAGATTACTTCAAATGGTCTTG  
 GACATACTATGAACATTCATACAAATGACAGAGACTTAGTAATGAAGTTTGTAAAAAACCAGCATCCCCTATATT  
 AGTTAATACTGGTGGAAGCCAAGGAGGACTGGTGCAAGCACAGGATTAGCACCTGCATTTACATTAGGTTGTG  
 GTACATGGGGAGGAAGCTCTGTTTCCGAAAATGTTACTCCATTACATTTAATCAATATAAAGAGAGTTGCATATG  
 GTCTTAAAGATTGTTCTACATTAGCTGCAGATGATACTTCAATCATCCTGAACTTTGTGGAAGCAAAAATGA  
 CTTAGGATGCTGTGCTACAAGCCCTGCAGAATTTGCAGCAATAGCAATTGTGCTAGCACTGCTGCGGATACTAC  
 TGATAATGATAAACTTGCTAGACTCGTAAGTGAATTAGTAGCTGCAATGAAGGGAGCTAACTAA

FIG. 51

Seq. ID 98: sequência de aminoácidos de desidrogenase de butiraldeído de *C. ragsdalei*

MEGTQLENFDKDLRSIQEARDLRLGKIAACEIADYTEEQIDKILCNMVRVAEENAVCLGKMAAEETGFGKAEDKAYK  
 NHMAATTVYNYIKDMKTIGVIKEDKSQGVIEFAEPVLLMGIVPSTNPTSTVIYKSIIAIKSRNAIVFSPHPAALKCSTKAI  
 ELMRDAAVAAGAPANVIGGIVTPSIQATNELMKAKEVAMIIATGGPGMVKAAYSSGTPAIGVGAGNSPSYIERTADV  
 HQSVKDIIASKSFDYGTICASEQSIIVEECNHDEVIAELKKQGGYFMTAEETAKVCSILFKPGTHSMSAKFVGRAPQVIAA  
 AAGFSVPEGTKVLVGEQGGVNGYPLSYEKLTTVLAFTVKDWHEACDLSIRLLQNLGHTMNIHTNDRDLVMKFAK  
 KPASRILVNTGGSQGGTGASTGLAPAFTLGCWTWGGSSVSENVPLHLINIKRVAYGLKDCSTLAADDTTFNHPELCGS  
 KNDLGCCATSPAFAANSNCASTAADTTDNDKLARLVSELVAAMKGAN\*

Seq. ID 99: sequência de nucleotídeos de desidrogenase de butiraldeído de *C. ragsdalei*

GTGGAAAATGCTGCACGAGCACAAAAATGTTAGCAACTTTCCGCAAGAAAAGTTAGATGAGATTGTTGAACG  
 TATGGCTGAAGAAATCGGAAAACATACCCGAGAGCTTGCTGTAATGTCACAGGATGAAACTGGTTATGGAAAAT  
 GGCAGGATAAATGCATCAAAAACCGATTTGCCTGTGAATATTTGCCAGCTAAGCTTAGAGGAATGCGATGTGTA  
 GGTATTATTAACGAAAATGGTCAGGATAAGACCATGGATGTAGGTGTACCTATGGGTGTAATTATTCATTATGT  
 CCTGCAACTAGTCCGGTTTCTACTACCATATATAAGGCATTAATTGCAATTAAGTCTGGTAATGCAATTATCTTTTC  
 TCCACATCCTAGAGCAAAGGAGACAATTTGTAAGGCGCTTGACATCATGATTCGTGCAGCTGAAGGATATGGGCT  
 GCCAGAAGGAGCTCTTGCACTTACATACTGTGACGCCTAGTGGAAACAATCGAATTGATGAACCATGAGGCGA  
 CTTCTTTGATTATGAATACAGGCGTTCCCGGGATGCTTAAAGCGTCATATAGATCTGGAAAACCTGTGATCTATGG  
 AGGAACTGGTAATGGACCAGCATTTATTGAACGTACAGCTGACATCAAGCAGGCGGTAAGAGATATTATTGCTA  
 GTAAGACCTTTGATAACGGAATAGTACCATCATCTGAACAATCTATTGTTGTAGATAGCTGTGTTGCATCTGATGT  
 TAAACGTGAGTTGCAAAATAGTGGTGCATATTTGATGACAGAGGAGGAAGCACAAAAACTGGGTTCTCTTTTT  
 CCGTTCTGATGGTAGTATGGATTGAGAAATGGTTGGCAATCCGCACAGAGATTGGCTAAGAAAGCAGGTTTCA  
 GTATTCCTGAAAGTAGCACAGTGCTAATTTGAGAGCAGAAATATGTTTCCCAAGATAATCCTTATTCCAAGGAGA  
 AACTTTGTCCGGTACTAGCTTACTACATTGAAGATGATTGGATGCATGCATGTGAAAAGTGTATTGAGCTGCTATT  
 AAGTGAGAGACATGGTCACACTCTTGTATACATTCAAAGACGAAGATGTAATTCGCCAGTTTGCATTAAAAAA  
 ACCTGTAGGCAGGATACTTGTTAATACGCCTGCTTCTTTGGTAGTATGGGTGCTACAAGTAATTTATTTCTGCTT  
 TAACTTTAGGTAGTGGATCGGCAGGTAAGGTATTACCTCCGATAATGTTTACCATAATGATTTTACGTCCG  
 TAAAGTCGGATATGGCGTACGGAATGTAGAAGAGATTATAACTAATGGATTGTTTACAGAAGAAAAAAGTG  
 ATTTGAGTGGTATGACAAAGCAGTCAGACTATAATCCAGAGGATATACAAATGTTGCAGCATATTTGAAAAAAG  
 CTATGGAAAAAATTAATAG

Seq. ID 100: sequência de aminoácidos de desidrogenase de butiraldeído de *C. ragsdalei*

VENAARAQKMLATFPQEKLEIVERMAEEIGKHTRELAVMSQDETGYGKWQDKCIKNRFACEYLPKLRGMRCVGI  
 NENGQDKTMDVGVPMGVIIALCPATSPVSTTIYKALIAIKSGNAIIFSPHPRAKETICKALDIMIRAAEGYGLPEGALAYL  
 HTVTPSGTIELMNHEATSLIMNTGVPGLKASYRSGKPVYGGTGNPFIERTADIKQAVRDIIASKTFDNGIVPSSEQ  
 SIVVDSVASDVKRELQNSGAYFMTEEEAQKLGSLFFRSDGSMSEMVGKSAQRLAKKAGFSIPESSTVLISEQKYVSQ  
 DNPYSKEKLCPLVAYIEDDWMHACEKCIELLSERHGHTLVIHSDKEDVIRQFALKKPVGRILVNTPASFGSMGATSNL  
 FPALTGSGSAGKGITSDNVSPMNLIVRVKVGVRNVEIINTNGLFTEEKSDLSGMTKQSDYNPEDIQMLQHILKKA  
 MEKIK\*

FIG. 52

Seq. ID 101: sequência de nucleotídeos de desidrogenase de butanol de *C. ragsdalei*

ATGGCAAGATTTACTTTACCAAGAGACATTTATTTGGAGAAAATTCATTAGAGACCTTGAAAAACCTAGATGGA  
 AAAAAAGCTGTCATTGTCGTAGGTGGAGGATCCATGAAAAGATTTGGATTCCTTGATAAGGTAGTAGACTACTTA  
 AAAGAAGCAGGTATTGAATCAAATAAATAGAAGGCGTTGAGCCAGATCCATCCGTAGAACTGTTATGAATGG  
 TGCTAAACTAATGAGGGAATATGGGCCAGATTTAATAATCAATAGGTGGAGGTTACCAATTGATGCAGCAA  
 AAGCTATGTGGATTTCTATGAATACCCTGAGTTTACTTTTAAAGAAGCTGTAGTTCCTTTGGTCTTCTAAATTA  
 AGACAAAAAGCAACATTTATAGCTATCCCTTCTACAAGTGGTACTGCAACGGAAGTAACTGCATTTTCTGTAATAA  
 CAGACTATAAAGCTAAAATTAATATCCTTTGGCTGACTTCAATTTAACACCAGATATAGCTATAATTGATCCAGT  
 ATTAGCTCAAACAATGCCGCTAAATTAAGTGCACATACTGGAATGGATGCACTTACTCACGCTATTGAAGCATAT  
 GTTGACAGGACTTCATTGATTTTCTCGGACCCACTTGCTATTCAAGCTATAGTCATGGTAAATCAATATTTAATTA  
 ATCTTACAATGAAGATAAAGAAGCTAGGGATCAAATGCATTTAGCTCAATGTTTAGCTGGAATGGCATTTCAAA  
 TGCACCTTCTGGAATAACTCACAGTTTAGCACATAAAACAGGTGCAGTATTCCATATCCCTCATGGATGTGCTAAT  
 GCAATATATCTTCTTATGTTATAGATTTCAATAAAAAAGCTTGTGCACCAAGATATGCTGATATAGCTAGGAGTC  
 TAAACTCCAGGAAATACTGATGATGAATTAGTAGATTCATTAATAATATGATTAAGATATGAACAAGAGTAT  
 GGATATTCCTTTGACATTAAGATTATGGAGTAGATGAAAAGAATTTAAAGATAGTGAAGATTTTATAGCTCA  
 TAATGCCGATTAGATGCCTGTACTGGATCAAATCCTAGAAGCATAAATGATGCTGAAATGAAAAGTTGTTAGA  
 ATACATCTATTATGGTAAAAAGGTTGATTTTAA

Seq. ID 102: sequência de aminoácidos de desidrogenase de butanol de *C. ragsdalei*

MARFTLPRDIYFGENSELTKNLDGKKAVIVVGGGSMKRFGFLDKVVDYLKEAGIESKLIIEGVEPDPSVETVMNGAKL  
 MREYGPDLIISIGGGSPIDAAMWIFWEYEFTEKAVVPPGLPKLRQKATFIAIPSTSGTATEVTAFAFSVITDYKAKIKYPL  
 ADFNLTPDIAIIDPVLAQTMPPKLTAAHTGMDALTHAIEAYVAGLHVSFSDPLAIQAIVMVNYLIKSYNEDKEARDQM  
 HLAQCLAGMAFSNALLGITHSLAHTGAVFHIPHGCAAIYLPYVIDFNKKACAPRYADIARSLKLPGNTDDELVDLSLT  
 NMIKDMNKSMDIPLTKLDYGVDEKEFKDSEDFIAHNAVLDACTGSNPRSINDAEMKKLLEYIYYGKKVDF\*

Seq. ID 103: sequência de nucleotídeos de desidrogenase de butanol de *C. ragsdalei*

ATGGGAAGATTTACTTTGCCTAGGGATATTTACTTTGGTGAAAATGCCTTAGAAAATTTAAAAATTTAGATGGA  
 AATAAAGCAGTAGTTGTTGTAGGTGGAGGATCTATGAAGAGATTTGGGTTCTTAGCCAAAGTTGAAGAATACTTA  
 AAAGAAGCAGGTATGGAAGTTAAATTAATAGAAGGTGTTGAGCCTGATCCATCTGTTGATACTGTTATGAATGGT  
 GCTAAAATAATGAGAGACTTAAATCCAGACTGGATAGTATCAATAGGTGGAGGATCTCCCATCGATGCTGCCAAA  
 GCAATGTGGATATTTTATGAATACCCTGACTTTACATTTGAAAAGCGGTAGTCCCTTTGGGATTCTAAATTA  
 GGCAAAAAGGCACAATTTGTTGCTATACCTTCTACAAGTGGAAACAGCAACTGAAGTAAACATCATTTTCTGTAATAAC  
 AGACTATAAAGCTAAAATAAATATCCTCTTGACAGATTTTAACTTACCCCTGATATAGCTATAATAGATCCGTCTC  
 TTGCAGAAAACATGCCTAAAAGCTTACAGCACACACTGGAATGGATGCACTTACTCACGCAATAGAAGCATATG  
 TGGCAAGTTTACATTCAGATTTTCTCAGATCCACTTGCTATGCATGCTATAACCATGATTCATAAATATTTATTGAAA  
 TCCTATGAAGAAGATAAAGAAGCTAGGGGCCATATGCACATAGCCCAATGTCTAGCTGGAATGGCATTTCAAAT  
 GCACTCCTTGAATAACTCATAGTATAGCACATAAACTGGCGCAGTATCCACATACCTCATGGGTGTGCTAATG  
 CCATATACTTACCTTATGTTATAGATTTTAAACAAGAAAGCTTGTTCAGAAAAGATATGCTAAAATAGCTAAAAGCT  
 TCATCTATCAGGGAATAGTGAAGATGAATTAATAGATTCATTAACAGAAATGATTTGACTATGAATAAAAAGAT  
 GGATATTCCTTACTATAAAGATTATGGTATAAGCGAAAACGATTTTAAATGAAAACCTAGATTTTATAGCTCAC  
 AATGCTATGATGGATGCTTGCCTGATCTAATCCTAGAGCAATAACTGAGGAAGAAATGAAAAGCTCTTGCA  
 GTATATGTATAATGGGCAAAAGGTTAATTTCTAG

Seq. ID 104: sequência de aminoácidos de desidrogenase de butanol de *C. ragsdalei*

MGRFTLPRDIYFGENALENLKNDGKAVVVVGGGSMKRFGFLAKVEEYLKEAGMEVKLIEGVEPDPSVDVTVMNGA  
KIMRDFNPDWIVSIGGGSPIDAAMWIFYEYPDFTFEKAVVFPGIPKLRQKAQFVAIPSTSGTATEVTSFSVITDYKAKI  
KYPLADFNLTPDIAIIDPSLAETMPKKLTAHTGMDALTHAIEAYVASLHSDPDLAMHAITMIHKYLLKSYEEDKEARG  
HMHIAQCLAGMAFSNALLGITHSIAHKTGAVFHIPHGCANAIYLPYVIDFNKKACSERYAKIAKKLHLSGNSEDELIDSLT  
EMICTMNNKMDIPLTIKDYGISENDFNENLDFIAHNAMMDACTGSNPRAITEEMKLLQYMYNGQKVN\*F\*

Seq. ID 105: sequência de nucleotídeos de desidrogenase de butanol de *C. ragsdalei*

ATGATTTTAAAACTAACTTTTTGGGCAAACCTTATGAATTTAAAAATATGAAGGAAGTATTGGCAAAGCTAAT  
GAAGAAAAATCGGGAGATGCTTTAGCTGGAATCATAGCAAAAAGTACAGCGGAGAGAGTTGCAGCAAAGGTTG  
TTTTGTCTGAAATAACTCTTGAGGAATTAAGGAATAATCCTGTAGTTCCTTATGAGGAGGATGAAGTAACAAGAG  
TAATACAAGATATGATTGATAAAGAAGCCTATAATAAAATCAAAGCTATGACAGTTGGCGAATTTAGAGAATTTA  
TATTAATCAGAAGAAGCCGATATAAAGAATAAGAGATGGATTAACCTCTGAGATGATAGCAGGTGTAACCT  
AAGCTTATGAGTAATATGGACTTAGTATATGCTTCTAAAAAATAAGAAATATTGCTACTTGCAACTACTACTATTG  
GTGAAAAGGGAACAGTCTCTCAAGACTTCAGCCTAATCATGCAGCAGATAGTATAGATGGAATTATGGCTTCTG  
TAATGGAAGGGATAAGCTATGGTATAGGTGATGCTGTAATAGGTTTAAACCCTGTAGTAGATACCATAGATAATA  
TATCAGAGATTTTAAAAATTTAAGCAGTTCATGATAAAATGGGATATACCTACACAAAATTGTGTACTTGCTCA  
TATAACAACGCAAATGGAGGCTTTAAGAAAGGAGTTCCTATGGATCTGATGTTCCAGAGTATAGCTGGTTCACA  
AAAATCCAATAAAGGCTTTGGAATAAGTGTGAAGCTTATGGATGAAGCTTATGAACTTATGAAGGAAAAAAGA  
GCTCAAAGGTCTAATTTTATGTATTTTGAACAGGCCAGGGTCTGAGCTTCTCAGAAGGCCATAATGGAGC  
AGATCAGCTTACAATGGAAGCAAGATGTTATGGTCTTGCAAAAAAATAAATCCATTCTTGAAACTCTGTGGTG  
GGATTCATAGGACCAGAATATCTATATGATGGAACAAATTATAAGAGCAGGCTTAGAAGATCATTATGGGT  
AAGTTAACAGGACTTCTATGGGTGTTGATGTATGTTATACAAACCATATGAAAGCAGATCAAAATGATTTGGAA  
AATTTAGCATTACTCCTTGACAGCAGCTGACTGTACTTATTTTATGGGTATACCTGGAGGAGATGACGTAATGCTTA  
TGTATCAAACCTACCAGCTATCATGATGTAGCTTCTATCAGGGACATTATGCGTAAAAATCCTATAAAAAGAAATTTGA  
AGAAAGAATGGAAGCTCTAGGAATAATGAAAAATGGAAGGCTCACAGAAATAGCTGGTGATCCATCTATATTTA  
TGATTTAG

Seq. ID 106: sequência de aminoácidos de desidrogenase de butanol de *C. ragsdalei*

MILKTKLFGQTYEFKNMKEVLAKANEKSGDALAGIIAKSTAERVAAKVVLSEITLLELRNPNVVPYEEDEVTRVIQDMI  
DKEAYNKIKAMTVGEFREFILKSEEDIKEIRDGLTSEMIAGVTKLMSNMDLVYASKKIRNIATCNTTIGEKGTVSSRLQP  
NHAADSIDGIMASVMEGISYGIGDAVIGLNPVVDITDNISEILKNFKQFMIKWDIPTQNCVLAHITTQMEALKKGVPM  
DLMFQSIAGSQKSNKGFISVKLMDEAYELMKEKSSKGNPFMYFETGGQSELSSEGHNGADQLTMEARCYGLAKKY  
NPFLVNSVVGFIGPEYLYDGKQHIRAGLEDHFMGKLTGLPMGVVDVVCYTNHMKADQNDLENLALLAAADCTYFMGIP  
GGDDVMLMYQTTSYHDVASIRDIMRKNPIKEFEERMEALGIMKNGRLTEIAGDPSIFMI\*

FIG. 54

Seq. ID 107: sequência de nucleotídeos de desidrogenase de butanol de *C. ragsdalei*:

ATGGAAGACTTTATTTTTAAAAATGCTACAGAAATTTTTGGTAAGGATACCGAAGATCTTGTAGGAAGTAA  
 GTAAAGGAGTATTCAAAGTCAGATAAAATACTCTTTGCTATGGGGGAGGAAGTATAAAGAGATCGGGCCTCTA  
 TGATAGAGTTATAAAGTCCTTAAAGAAAATGGAATTGAATTTATAGAACTCCAGGAATTAACCTAATCCAAG  
 ATTAGGACCTGTTAAAGAAGGTATAAGACTATGTAGAGAAAATAATAAAATTTGACTACTCTGTAGGAGGAG  
 GAAGTTCAGCAGATACAGCTAAAGCTATTGCTGTAGGAGTACCTTATAAAGGAGATGTATGGGATTTTTATACGG  
 GCAAAGCTGAAGTAAAGAGGCTCTCCTGTAGGAGTTGTAATAACATTACCTGCTACAGGTACAGAATCTAGTA  
 ATAGTTCTGTTATTATGAATGAAGATGGTTGGTTTTAAAAAGGATTAAATACGGTACTTATAAGACCTGCTTTTTC  
 AATTATGAATCCTGAACCTACTTTTTACACTACCAGAATATCAAAGTCTTGTGGTCTTGTGACATTATGGCACATA  
 TAATGGAAAGATATTTTACAAATGTGAAACATGTAGATTTAACTGATAGGCTTTGCGAAGCTGCACTTAGAAATG  
 TTATAAATAATGCCCAATAGTTTTAAAAAGATCCTAAAAATTATGATGCTAGGGCAGAAATTATGTGGACTGGTA  
 CTATAGCTCATAATGATGTGCTTAGTACAGGTAGAATAGGTGATTGGGCTTCTCACAAAATTGAACATGAATTAA  
 GTGGGGAACAGATATTGCCCATGGAGCAGGACTTGCAATTGTATTTCTGCATGGATGAAATATGTATATAAC  
 ATGATATCAATAGATTTGTACAATTTGCAGTAAGGGTATGGGATGTAGATTTATCTTATAGTTCTGTGAAGATAT  
 TGACTTGAAGGCATAAGGAGAATGACAGCATTTTCAAGAGCATGGGGTTACCTATAACTTTAAAGAAGGAA  
 GTATAGGAGAAGATAAAATTGAAGAAATGGCTAATAAGTGCACGGATAATGGAACCAAACTGTAGGACAATTT  
 GTAAAACATAAAGATGATATTGAAAAATATTAATTTAGCTAGATAA

Seq. ID 108: sequência de aminoácidos de desidrogenase de butanol de *C. ragsdalei*:

MENFIFKNATEIIFGKDTEDLVGSKVKEYSKSDKILFCYGGGSIKRSGLYDRVIKSLKENGIEFIEPLGKIPNPRLPVKEGIR  
 LCRENNIKVLSVGGSSADTAKAIAVGVYPYKGDVWDFYTGKAEVKEALPVGVVITLPATGTESSNSSVIMNEDGWFK  
 KGLNVLIRPAFSIMNPELFTLPEYQTACGACDIMAHIMERYFTNVKHVDLTDRLCEALRNVINNAPIVLKDPKNYD  
 ARAEIMWTGTIAHNDVLSTGRIGDWASHKIEHELSETDIAHGAGLAIVFPAWMKYVYKHDINRFVQFAVRVWVDV  
 LSYSSCEDIVLEGIRRMATAFFKSMGLPITLKEGSIKEDKIEEMANKCTDNGTKTVGQFVKNLKDIDIVKILNLR\*

Seq. ID 109: sequência de nucleotídeos de desidrogenase de butanol de *C. ragsdalei*:

ATGGAAGACAAGTTTGAAAAATTTAATTTGAAATCCAAGATTTATTTAATAGGGAATCCATACAACCTTTAGAGC  
 AGGTTACTGGCTCTCGAGCATTATTGTTGCAGATGCCATTATGGGAAAACCTGGATATCTTCAAAAAGTAATAG  
 ATCCCTAAGTAAAGCCGGAATAAGTCCGTTGTTTTACGGGAGTACACCCTGATCCAGATGTCAATGTAATTGC  
 AGATGCAATGAAATGTACAACAAAAGCGATGCAGATGTTCTCGTTGCACTAGGTGGAGGCTCCAGCATTGATAC  
 CGCCAAAGGAATAATGTATTTGCATGTAATTTAGGAAAAGCAATGGGCCAGGAAATGAAAAGCCCCTGTTTAT  
 TGCAATTCATCAACAAGTGAACAGGCTCTGAAGTAACAACTTTACTGTTATTACTTCTCAGAAAAGAAAAGGT  
 ATGCATTGTAGATGATTTTATTGCACCAGACGTTGCAATACTTGACTCTAGTTGTATTGATGGTCTGCCTCAACGT  
 ATTTAGCAGATACTGGTATAGATTTCTAGTTCAATCTATTGAAGCCTATGTTTCCAAAAAGCAACTGACTTTA  
 CAGACGCTCTTGCTGAAAAAGCAGTTAAATTGATTTTTGAGAATCTTCAAAAATTTATAACGATAGTAAAGATTC  
 TGAAGCTCGAGATCATGTTCAAAACGCTTCTGTATAGCAGGAATAGCATTTFACAAATGCTGGTCTTGGAAATTAAT  
 CACAGCTTGGCTCATGCTATGGGTGGATCTTTTACATTCCTCACGGCCGATCCAATGCACTTTTACTTAATGCAGT  
 AATGGAATACAATGCTAGCTTAGTGGGAAATGCAAACGATCATGCTATGGAAAAATACGCAAAACTAGCATCAG  
 TTCTACACCTCCAGCTCGAACAACCTCGTGAAGGCGCTGTAAGTTTTATCGAAGCTGTAATAAATTAATAAAATC  
 CCTAGGTGTTGAAGATAATATTCGAGCTCTTGGAAATTAAGAAGACGATTTTCAAGGTGCTCTAAATCATATGGC  
 AGAAACAGCAATGCAAGATAGATGCACTCCAATAATCCTAGAAAACCTTCTAAAGAAGAACTGATACATATTTA  
 TCAAAAATGCTATTA



Seq. ID 110: sequência de aminoácidos de desidrogenase de butanol *C. ragsdalei*  
 MEDKFNENLKSkiYFNRESIQLEQVTGSRAFIVADAIMGKGLYLQKVIDSLSKAGISSVVFTGVHPDPDVIADAMK  
 LYNKSDADVLVALGGSSIDTAKGIMYFACNLGKAMGQEMKKPLFIAIPSTSGTGSEVTNFTVITSQKEKVCIVDDFIAP  
 DVAILDSSCIDGLPQRIVADTGIDVLVHSIEAYVSKKATDFTDALAEKAVKLIFENLPKIYNDSKDSEARHDVQNASCIAGI  
 AFTNAGLGINHSLAHAMGGSFHIPHGRSNALLLNAVMEYNASLVGNANDHAMEKYAKLASVLHLPARTTREGAVSFI  
 EAVNKLKSLGVEDNIRALGIKEDDFQALNHMAETAMQDRCTPTNPRKPSKEELIHIVQKCY\*

Seq. ID 111: sequência de nucleotídeos de butiril/acetil transferase de fosfato de *C. ragsdalei*  
 ATGGAAAAATTTGGAATAAGGCAAAGGAAGACAAAAAAGATTGTCTTAGCTGAAGGAGAAGAAGAAAGAA  
 CTCTTCAAGCTTGAAAAAATAATTAAGAAGGTATTGCAAAATTAATCCTTGTAGGGAATGAAAAGGTAATAG  
 AGGAGAAGGCATCAAAATTAGGCCTAAGTTTAAATGGAGCAGAAATAGTAGATCCAGAAACCTCGGATAAACTA  
 AAAAAATATGCAGATGCTTTTTATGAATTGAGAAAGAAGAAGGGAATAACACCAGAAAAAGCGGATAAAATAGT  
 AAGAGATCCAATATATTTTGTACGATGATGGTTAAGCTTGGAGATGCAGATGGATTGGTTTCAGGTGCAGTGCA  
 TACTACAGGTGATCTTTGAGACCAGGACTTCAAATAGTAAAGACAGCTCCAGGTACATCAGTAGTTCCAGCAC  
 ATTTATAATGGAAGTACCAAATTTGGAATATGGTGACAATGGTGTACTTCTATTGCTGATTGTGCTGTAATCCA  
 TGCCAGATAGTGATCAATTGGCTTCAATTGCAATAAGTACAGCAGAACTGCAAAGAACTTATGTGGAATGGAT  
 CCAAAGTAGCAATGCTTTTCAATTTCTACTAAGGGAAGTGCAAACACGAATTAGTAGATAAAGTTAGAAATGCT  
 GTAGAAATTGCCAAAAAGCTAAACCAGATTTAAGTTTGGACGGAGAATTACAATTAGATGCCTCTATCGTAGAA  
 AAGTTGCAAGTTTAAAGGCTCCTGAAAGTGAAGTAGCAGGAAAAGCAAATGTACTTGTATTTCCAGATCTCCAA  
 GCAGGAAATATAGGTTATAAATGTTCAAAGATTTGCAAAGCTGATGCTATAGGACTGTATGCCAGGGATT  
 GCAAACCTATAAATGATTTGTCAAGAGGATGTAACCTCGATGATATAGTAAATGTAGTAGCTGTAACAGCAGTT  
 CAGGCACAAGCTCAAAGTAA

Seq. ID 112: sequência de aminoácidos de butiril/acetil transferase de fosfato de *C. ragsdalei*  
 MEKIWNKAKEDKKKIVLAEGEEERTLQACEKIIKEGIANLILVGNKVIIEEKASKLGVSLNGAEIVDPETSDKLLKYYADAFY  
 ELRKKKGITPEKADKIVRDIPIYFATMMVKLGDADGLVSGAVHTTGDLLRPLQIVKTAPGTSVVSSTFIMEVNPCEYGD  
 NGVLLFADCAVNP CPDSDQLASIAISTAETAENLCLGMDPKVAMLSFSTKGSAKHELVDKVRNAVEIAKKKPDLSLDG  
 ELQLDASIVEKVASLKAPSEVAGKANVLVFPDLQAGNIGYKLVQRFAKADAIGPVCQGFAPKINDLSRGCNSDDIVNV  
 VAVTAVQAQAQK\*

Seq. ID 113: sequência de nucleotídeos de quinase de acetato/butirato de *C. ragsdalei*  
 ATGAAAATATTAGTAGTAACTGTGGAAGTTCATCTTTAAATATCAACTTATTGATATGAAAGATGAAAGCGTT  
 GTGGCAAAGGACTTGAGAAAGAATAGGAGCAGAAGTTTCAAGTTTAAACATAAAGTTAACGGAGAAAAGTT  
 TGTTACAGAGCAGCCAAATGGAAGATCATAAAGTTGCTATACAATTAGTATTAATGCTCTTGTAGATAAAAAACA  
 TGGTGTAAATAAAGATATGTCAGAAATATCTGCTGTAGGGCATAGAGTTTGCATGGTGGAAAAAATATGCGG  
 CATCCATTCTTATTGATGACAATGTAATGAAAGCAATAGAAGAATGTATCCATTAGGACCATTACATAATCCAGC  
 TAATATAATGGGAATAGATGCTTGTAATAAATAAATGCCAAATACTCCAATGGTAGCAGTATTTGATACAGCATT  
 CATCAGACAATGCCAGATTATGCTTATACTTATGCAATACCTTATGATATATCTGAAAAGTATGATATCAGAAAAT  
 ATGGTTTTCATGGAACCTTCATAGATTCGTTTCAATTGAAGCAGCCAAGTTGTTAAAGAAAGATCCAAAAGATCT  
 TAAGCTAATAACTTGTCAATTTAGGAAATGGAGCTAGTATATGTGCAGTAAACCAGGGAAAAGCAGTAGATACAA  
 CTATGGGACTTACTCCCCTTGCAGGACTTGTAAATGGGAAGTATGATGTTGATATAGATCCAGCTATAATACCATT  
 TGTAATGAAAAGAAGCAGGTATGCTGTAGATGAAATGGATACTTTAATGAACAAAAGTCCAGGAATACTTGGAG  
 TATCAGGAGTAAGCAGCGATTTTAGAGATGTAGAAGAAGCTGCAAATTCAGGAAATGATAGAGCAAAACTTGCA  
 TAAATATGTATTATCACAAGTTAAATCTTTCATAGGAGCTTATGTTGCAAGTTTAAATGGAGCAGATGCTATAA  
 TATTTACAGCAGGACTTGGAGAAAATTCAGCTACTAGCAGATCTGCTATATGTAAGGGATTAAGCTATTTGGAA  
 TAAAATAGATGAAGAAAAGAATAAGAAAAGGGGAGAAGCACTAGAAAATAAGCACACCTGATTCAAAGATAAA  
 AGTATTAGTAATCTCAAAATGAAGAAGTATGATAGCTAGGGATACAAAAGAAATAGTTGAAAATAAATAA

FIG. 56

Seq. ID 114: sequência de aminoácidos de quinase de acetato/butirato de *C. ragsdalei*:

MKILVNCGSSSLKYQLIDMKDESVAKGLVERIGAEGSVLTHKVNGEKVTEQPMEDHKVAIQVLVNLVDKKGVI  
KDMSEISAVGHRVLHGGKKYAASILIDNVMKAIEECIPLGPLHNPNANIMGIDACKKLMNPMPVAVFDTAHQTMP  
DYAYTYAIPYDISEKYDIRKYGFHGTSHRFVSI EA AKLLKDPKDLKLITCHLNGASICAVNQGKAVDTTMTGLTLAGLV  
MGTRCGDIDPAIIPFVMKRTGMSVDEMDTLMNKKSGILGVSGVSSDFRDVEEAANSNDRAKLALNMYHVKVKSFI  
GAYVAVLNGADAIHFTAGLGENSATSRSIAICKGLSYFGIKIDEEKNKKRGEALEISTPDSKIKVLVIPTNEELMIARDTKEIV  
ENK\*

Seq. ID 115: sequência de nucleotídeos de óxido-redutase de aldeído:ferredoxina de *C. ragsdalei*:

ATGTACGGATATAATGGTAAGGTATTAAGAATTAATCTAAGTAGTAAAACCTTATATAGTGGAAAGTAAAAATT  
GACAAAAGCTAAAAAATTTATAGGTGCAAGAGGTTTAGGCGTAAAAACCTTATTTGACGAAGTAGATCCAAAGGT  
AGATCCATTACACCTGATAACAAATTTATATAGCAGCGGGACCACTTACAGGTGCGCCTGTTCCAACAAGCGG  
AAGATTCATGGTAGTTACTAAACACCTTTAACAGGAACTATTGCTATTGCAAATTCAGGTGGAAAATGGGGAGC  
AGAATTCAAAAGCAGCTGGATACGATGATAAATCGTTGAAGGTAATCTGATAAAGAAGTTTATGTAAATATAGT  
AGATGATAAAGTAGAATTTAGGGATGCTTCTCATGTTTGGGGAAAACTAACAGAAGAACTACAAAAATGCTTCA  
ACAGGAAAACAGATTCCGAGAGCTAAGGTTTTATGCATAGGACCAGCTGGGGAAAAATATCACTTATGGCAGCAG  
TTATGAATGATGTTGATAGAACAGCAGGACGTGGTGGTGGTGGAGCTGTTATGGGCTCAAAGAACTTAAAGCT  
ATTGTAGTTAAAGGAAGCGGAAAAAGTAAATTTATTTGATGAGCAAAAAGTGAAGAAGTAGCACTTGAGAAAAC  
AAATATTTTAAAGAAAAGATCCAGTAGCTGGTGGAGGACTTCCAACATACGGAACAGCTGTACTTGTTAATATTAT  
AAATGAAAATGGCGTACATCCAGTAAAAATTTCCAAAACTTATACAGATCAGGCAGATAAGATCAGTGGAG  
AAACTTTAACTAAAGATTGCTTAGTTAGAAAAATCCTTGCTATAGGTGTC AATTGCCTGTGGAAGATGGGTAA  
AACTTGATGATGGAACGAATGTGGAGGACCAGAATATGAAACATTATGGTCATTTGGATCTGATTGTGATGTAT  
ACGATATAAATGCTGTAAATACAGCAAATATGTTGTGAATGAATATGGATTAGATACCATTACAGCAGGATGTA  
CTATTGCAGCAGCTATGGAACCTTATCAAAGAGGTTATATTAAGGATGAAGAAATAGCAGCAGATGGATTGTCAC  
TTAATTGGGGAGATGCTAAGTCCATGGTTGAATGGGTAAAGAAAATGGGACTTAGAGAAGGATTTGGAGACAA  
GATGGCAGATGGTTCATACAGACTTTGTGACTCATACGGTGTACCTGAGTATTCAATGACTGTAAAAAAACAAGA  
AATCCAGCATATGACCCAAGAGGAATACAGGGACATGGTATAACTTATGCTGTTAACAATAGGGGAGGGTGTG  
ATATTAAGGGATATATGGTAAGCCCTGAAACTTGGTTATCCAGAAAACTTGATAGACTTGCAGTGGAAAGGAA  
AAGCAGGATATGCTAGAGTATTCCATGATTTAACAGCTGTTATAGATTCACTTGGATTATGATTTTTACAACATT  
GGTCTTGGTGCACAGGATTATGTTGATTTGTATAATGCAGTAGTTGGTGGAGAATTACATGATGTAGACTCTTTA  
ATGTTAGCTGGAGATAGAATATGGACTTTAGAAAAAATATTTAACTTAAAGGCAGGCATAGATAGTTCACAGGAT  
ACTCTTCAAAGAGATTGCTTGAGGAACAGTTCAGAAAGGACCATCAAAGGAGAGATTATAGATTAGATGTA  
CTTCTTCTGAATATTATTCAGTACGTGGATGGGATAAAAAATGGTATACCTACAGAGGAAACGTTAAAGAAATTA  
GGATTAGATGAATATGTAGGTAAGTTTTAA

Seq. ID 116: sequência de aminoácidos de óxido-redutase de aldeído:ferredoxina de *C. ragsdalei*:

MYGYNGKVLRLINLSSKTYIVEELKIDKAKKFIGARGLGVKTLFDEVDPKVDPLSPDNKFIIAAGPLTGAPVPTSGRFMVV  
KSPLTGITAIANS GGK WGA EFKAAGYDMIIVEGKSDKEVYVNI VDDKVEFRDASHVWGKLT EETKMLQQETDSRAK  
VLCIGPAGEKLSLMAAVMNDVDRTAGRGGVGAVMGSKNLKAIVVKGSGKVKLFDEQKVEVALEKTNILRKDPVAG  
GGLPTYGTAVLVNIINENGVHPVKNFQKSYTDQADKISGETLTKDCLVRKNPCYRCPIACGRVWVKLDDGTECGGPEYE  
TLWSFGSDCDVDINAVNTANMLCNEYGLDTITAGCTIAAAMELYQRGYKDEEIAADGLSLNWGDAKSMVEWVKK  
MGLREGFGDKMADGSYRLCDSYGVPEYSMTVKKQEIPAYDPRGIQGHGITYAVNNRGGCHIKGYMVSPEILGYPEKL  
DRLAVEGKAGYARVFHDLTAVIDSLGLCIFTTFGLGAQDYVDLYNAVVGELHDVDSLMLAGDRIWTLKIFNLKAGID  
SSQDTLPKRLLPEEPVPEGSKGEIHRDLVLLPEYSVRGWDKNGIPT EETLKKLGLDEYVVKF\*

FIG. 57

Seq. ID 117: sequência de nucleotídeos de óxido-redutase de aldeído:ferredoxina de *C. ragsdalei*:

ATGTATGGTTATAATGGTAAAGTATTAAGAATTAATTTAAAAGAAAGAACTTGCAAATCAGAAAATTTAGATTTAGATAAAGC  
 TAAAAGTTTATAGGCTGTAGGGGACTAGGTGTTAAAACCTTTATTTGATGAAATAGATCCTAAAATAGATGCATTATCACCAG  
 AAAATAAATTTATAATTGTAACAGGTCCGTTAACTGGAGCTCCAGTTCCTCAACTAGTGGAAAGGTTTATGGTAGTTACTAAAGCA  
 CCGCTTACAGGAAGTATAGGAATTTCAAATTCGGGTGGAAAATGGGGAGTAGACTTGAAAAAGCTGGCTGGGATATGATA  
 ATAGTAGAGGATAAGGCTGATTCACCAGTTTACATTGAAATAGTAGATGATAAAGTAGAAAATTAAGATGCGTCACAGCTTT  
 GGGGAAAAGTTACATCAGAAAACACAAAAGAGTTAGAAAAGATAACTGAGAATAGATCAAAGGTATTATGTATAGGACCTG  
 CTGGTGAAAAGATTGCCCTTATGGCAGCAGTTATGAATGATGTAGATAGAACTGCAGCAAGAGGGCGGCTTGGTGCAGTTAT  
 GGGATCTAAAAACTTAAAAGCTATTACAGTTAAAGGAACTGGAAAATAGCTTTAGCTGATAAAGAAAAAGTAAAAAAGTG  
 TCCGTAGAAAAAATTAACAACATTAATAAATGATCCAGTAGCTGGTCAGGGAATGCCAACTTATGGTACAGCTATACTGGTTAA  
 TATAATAAATGAAAATGGAGTTCATCCTGTAATAATTTCAAGAATCTTATACGGATCAAGCAGATAAAAATAAGTGGAGAGA  
 CTCTTACTGCTAACCAACTAGTAAGGAAAAATCCTTGTACAGCTGCTCTATAGGTTGTGGAAAGATGGGTAGACTAAAAGAT  
 GGTACAGAGTGCAGGAGACCAGGAGTATGAAACACTGTGGTGTGGCTGCTGACTGTGGTTCATATGATTTAGATGCTATAA  
 ATGAAGCTAATATGTTATGTAATGAATATGGTATTGATACTATTACCTGTGGTGCAACAATTGCTGCAGCTATGGAACCTTATC  
 AAAGAGGATATGTAAGATGAAGAAATAGCCGGAGATAACCTATCTCAAGTGGGGAGATACGGAGTCTATGATTGGCT  
 GGATAAAGAAAAATGGTATATAGTGAAGGCTTTGGAGCAAAGATGACAAAATGGTTCATATAGGCTTTGTGAAGTTATGGAG  
 TACCTGAGTATTCTATGACAGTTAAAAAGCAAGAAATTCAGCATATGATCCAAGGGGAATACAGGGACATGGTATTACCTAT  
 GCAGTTAATAATAGAGGAGGATGTCATATTAAGGGATATATGATTAATCCTGAAATATTAGGTTATCCGGAAAAACTTGATA  
 GATTTGCATTAGATGGTAAAGCAGCCTATGCCAAAATGATGCATGATTTAACTGCTGTAATTGATTCTTTAGGATTGTGCATAT  
 TCACTACATTTGGGCTTGGAAATACAGGATTATGTAGATATGTATAATGCAAGTAGTAGGAGAAATCTACTTGTGATTAGATTCA  
 CTATTAGAGGCAGGAGATAGAGTATGGACTCTTAAAAATTTAATCTTGCAGCTGGAATAGACAGCAGCCAGGATACTC  
 TACCAAAGAGATTGTTAGAAGAACCTATTCAGATGGTCCATCAAAGGGACACGTTTATAGGCTAGATGTTCTTCTGCCAGAA  
 TATTACTCAGTACGAGGATGGAGTAAAGAGGGTATACCTACAGAAGAAACATTAAGAAATTAGGATTAGATGAATATATAG  
 GTAAGTTCTAG

Seq. ID 117: sequência de nucleotídeos de óxido-redutase de aldeído:ferredoxina de *C. ragsdalei*:

MYGNGKVLRLNKLKERTCKSENLDLAKKFFIGCRGLGVKTLFDEIDPKIDALSPENKFIIVTGPLTGAPVPTSGRFMVVTKAPLTGTI  
 GISNSGGKVGVDLKKAGWDMIIVEDKADSPVYIEIVDDKVEIKDASQLWGKVTSETTKELEKITENRSKVLICIGPAGERLSLMAAV  
 MNDVDRTAARGGVGAVMGSKNLKAITVKGTGKIALADKEKVKVSVVEKITTLPKNDPVAGQGMPYTGAILVNIINENGVHPVNN  
 FQESYTDQADKISGETLTANQLVRKNPCYSCPIGCGRWVRLKDGTECGGPEYETLWCFGSDCGSYDLDAINEANMLCNEYGIDTIT  
 CGATIAAMELYQRGYVKDEEIAAGDNLSLKWGDTESMIGWIKKMYVSEGFAGKMTNGSYRLCEYGVPEYSMTVKKQEIAPYDP  
 RGIQGHGITYAVNNRGGCHIKGYMINPEILGYPEKLDRLFALDGAAAYAKMMHDLTAVIDSLGLCIFTTFLGLIQDYVDMYNAVVGE  
 STCDSLSLLEAGDRVWVTLKLFNLAAGIDSSQDTLPKRLLEPIPDGPKGHVHRLDVLLPEYYSVRGWSKEGIPTEETLKKLGLDEYI  
 GKF\*

FIG. 58

Seq. ID 136: Gene de rRNA 16S de *Clostridium ljungdahlii* (CP001666.1, GI:300433347)

TTAAATTAAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGATGAAGCTCCTTC  
GGGAGTGGATTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTACCTCAAAGAGGGGGATAGCCTCCCGAAAGGGGAGA  
TTAATACCGCATAATAATCAGTTTTACATGGAGACTGATTTAAAGGAGTAATCCGCTTTGAGATGGACCCGCGCGCATTAG  
CTAGTTGGTAGGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGAAGTGAAGAG  
ACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCAACGCCGCGTGAGT  
GAAGAAGTTTTCGGATTGTAAAGCTCTGTCTTTGGGGACGATAATGACGGTACCCAAGGAGGAAGCCACGGCTAACTACGT  
GCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGTGCCTAGGCGGATATTTAAG  
TGAGATGTGAAATACCCGGGCTTAACCCGGGCACTGCATTTCAAAGTGGATATCTAGAGTGCGGGAGAGGAGAATGGAATT  
CCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTAGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGATTCTCTGGACCGTAACTGACGCTGA  
GGCAGCAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTACTAGGTGTAGGAGGT  
ATCGACCCCTTCTGTGCCGAGTAAACACAATAAGTACTCCGCTGGGAAGTACGATCGCAAGATTAAGAACTCAAAGGAATT  
GACGGGGGCCCCACAAGCAGCGGAGCATGTGGTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGACTTGACATACCCT  
GAATATCTTAGAGATAAGAGAAGCCCTTCGGGGCAGGGATACAGGTGGTGCATGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATG  
TTAGGTTAAGTCTGCAACGAGCGCAACCCCTGTTGTTAGTTGCTAACATTTAGTTGAGCACTCTAGCAAGACTGCCGCGGTT  
AACGCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCAACACAGTGTCTACAATGGGCAGTAC  
AGAGAGAAGCAAGACCGCAAGGTGGAGCAAACCTCAAAAAGTCCCGGAGTTCCGGATTGCAGGCTGAAACTCGCCTACATG  
AAGTTGGAGTTGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCGTCACACCAT  
GAGAGCTGGCAACACCCGAAGTCCGTAGTCTAACTAGGAGGACGCGGCCGAAGGTGGGGTTAGTAATTGGGGTGA

FIG. 59

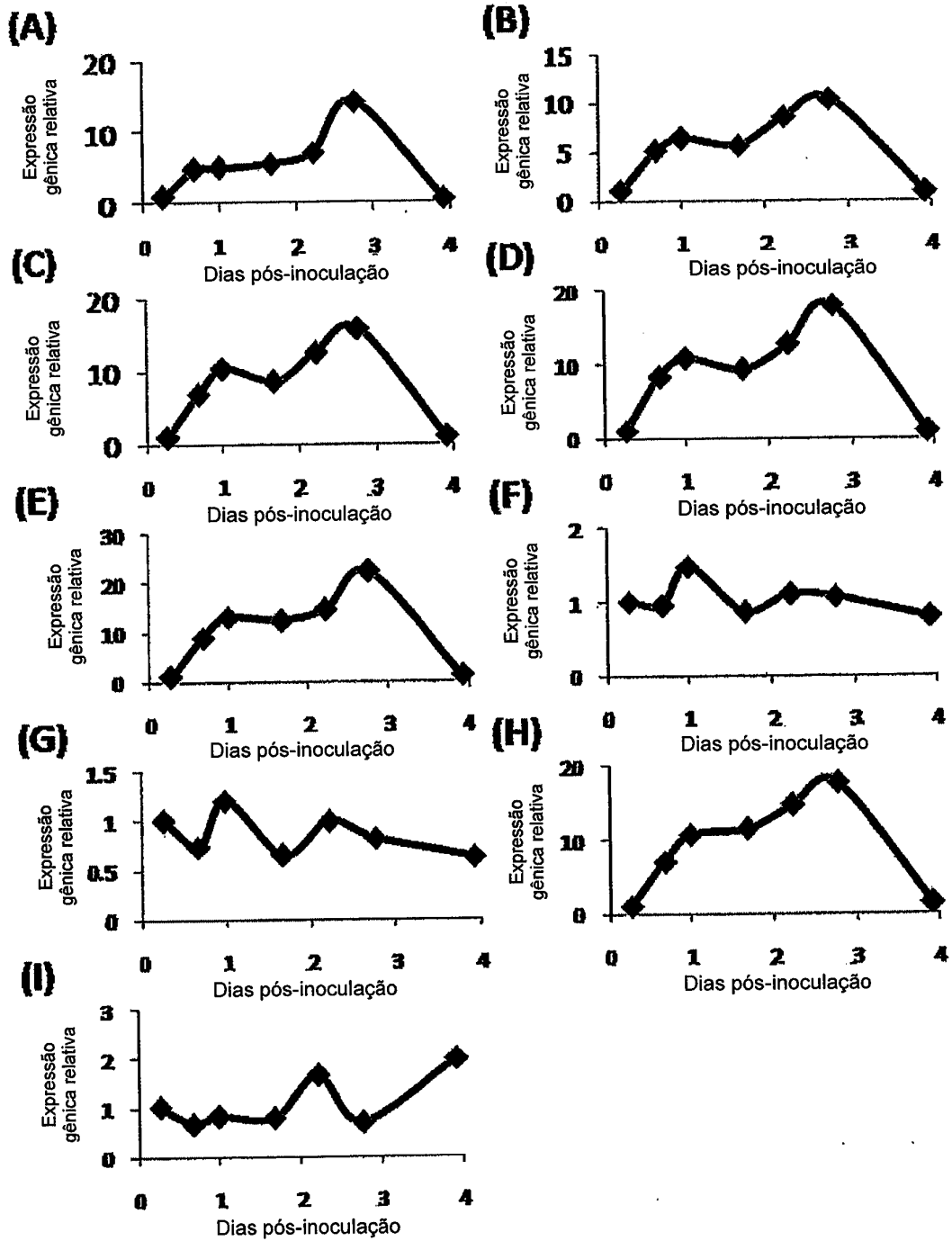


FIG. 60